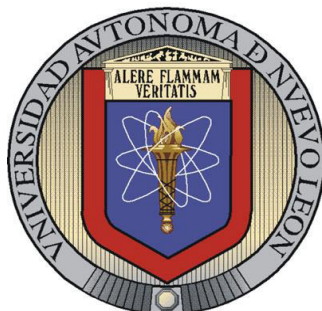


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA**



**TESIS**

**“NANOTUBOS DE ALEACIÓN DE TITANIO COMO SISTEMAS DE  
ENCAPSULACIÓN Y LIBERACIÓN DE LA ENZIMA BROMELINA”**

**PRESENTADA POR:**

**ANGEL ABRAHAM ALEJANDRO GUERRERO GARZA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA  
CON ESPECIALIDAD EN NANOTECNOLOGÍA**

**2018**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA**



**Nanotubos de aleación de titanio como sistemas de encapsulación y liberación de la  
enzima Bromelina**

**Por**

**ANGEL ABRAHAM ALEJANDRO GUERRERO GARZA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA CON ESPECIALIDAD  
EN NANOTECNOLOGÍA 2018**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA**  
**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

Los miembros del Comité de Tesis recomendamos que la Tesis Nanotubos de aleación de titanio como sistemas de encapsulación y liberación de la enzima bromelina] realizada por el alumno(a) Angel Abraham Alejandro Guerrero Garza ,con número de matrícula 1509145 , sea aceptada para su defensa como opción al grado de Maestría en Ciencias de la Ingeniería con orientación en Nanotecnología

El Comité de Tesis

Dr. Iván Eleazar Moreno Cortez  
Director

Dr Luis Alberto López Pavón  
Revisor

Dr. Alejandro Estrada de la Vega  
Revisor

Vo. Bo.

Dr. Simón Martínez Martínez  
Subdirector de Estudios de Posgrado



San Nicolás de los Garza, Nuevo León, 21 de noviembre de 2018

## **Dedicatorias**

A mis padres Celia Garza Pérez y Carlos Abraham Guerrero Martínez por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo, así como sus consejos y valores los cuales me han llevado a ser la persona que soy en la actualidad.

A mis hermanas por el apoyo moral que me brindaron en el transcurso de mi posgrado.

A mi novia Cindy Yareli Barrera Pérez por hacerme sentir fuerte en momentos de debilidad y por ampliar mi visión de la vida, así como de la ciencia, además de apoyarme en la resolución de los retos que se presentaron a lo largo de mi carrera.

A mi abuelo Sergio Garza Gonzales el cual, aunque no está ya conmigo físicamente me dejó un legado de conocimiento y enseñanzas.

A mis amigos, familiares y todas aquellas personas que aportaron a lo largo de este logro para que pudiera concluirlo.

“Conéctate con un científico y te estarás conectando con un niño.”

-Ray Bradbury-

## **Agradecimientos**

Agradezco a mi asesor Dr. Iván E. Moreno Cortez por ser un guía durante esta travesía, por haberme apoyado con su tiempo y conocimiento y sobre todo por ayudarme a entender que la dedicación y paciencia son un elemento fundamental en la ciencia.

A mi co asesor Dr. Luis A. López Pavón por el apoyo y conocimiento aportado a mi investigación además del tiempo invertido.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica por el apoyo brindado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo recibido durante la realización de este trabajo.

A mis compañeras Andrea y Julia por transmitir parte de su conocimiento y aportarme su amistad.

A mis compañeros de laboratorio quienes me han dejado enseñanzas a lo largo de mi carrera.

A todos aquellos que contribuyeron directa e indirectamente en este trabajo de tesis.

“Después de todo, ¿qué es un científico entonces? Es un Hombre curioso que mira a través del ojo de una cerradura, la cerradura de la naturaleza, tratando de saber qué es lo que sucede.”

-Jacques Yves Cousteau-

## Tabla de contenido

Lista de figuras .....	8
Resumen .....	9
Introducción.....	9
1. Antecedentes.....	10
1.1 Aleaciones de titanio y su uso en biomedicina .....	10
1.1.2 Nanotubos de titanio, síntesis y variables de control .....	11
1.1.3 Aleación $Ti_{24}Zn_{10}Nb_2Sn$ .....	13
1.2 Enzimas.....	14
1.2.1 Clasificación de las enzimas .....	15
1.2.2 Propiedades de las enzimas como catalizadores naturales .....	16
1.2.3 Importancia de la encapsulación enzimática .....	16
1.3 Uso de enzimas en una matriz de nanotubos de titanio .....	17
1.4 Bromelina.....	18
1.4.1 Propiedades bioquímicas de la bromelina .....	19
1.4.2 Usos biomédicos de la bromelina .....	19
1.4.3 Encapsulación de la bromelina.....	20
1.5 Control de liberación por medio de un recubrimiento polimérico .....	20
1.6 Electrohilado .....	21
1.6.1 Membranas nanofibrosas poliméricas con potencial aplicación en el control de la liberación enzimática.....	22
2. Hipótesis .....	24
3. Objetivo General .....	24
4. Objetivos Específicos.....	24
5. Materiales y reactivos.....	24
6. Equipos utilizados .....	25

7. Metodología.....	25
7.1 Síntesis de nanotubos de aleación de titanio por anodizado electroquímico .....	26
7.1.1 Química del anodizado electroquímico. ....	27
7.2 Encapsulación enzimática .....	28
7.2.1 Encapsulación de BSA .....	28
7.3 Método de carga para la encapsulación enzimática.....	29
7.4 Preparación de buffer de fosfato PBS.....	30
7.5 Método Bradford .....	30
7.6 Actividad enzimática .....	31
7.6.1 Disoluciones utilizadas para liberación enzimática .....	32
7.7 Electrohilado sobre nanotubos .....	33
7.8 Medición de nanofibras y nanotubos.....	34
8. Resultados y discusión .....	34
8.1 Análisis morfológico de los nanotubos de titanio .....	34
8.2 Liberación enzimática.....	39
8.3 Electrohilado sobre nanotubos .....	43
9. Conclusiones.....	46
10. Referencias .....	47
11. Referencias de imágenes .....	53

## Lista de figuras

<b>FIG. 1 NANOTUBO DE CARBONO DE PARED MÚLTIPLE (POSGRADOEINVESTIGACION UADEC)</b>	11
<b>FIG. 2 PRÓTESIS ARTICULAR DE RODILLA UTILIZANDO ALEACIÓN DE TITANIO PARA SU FABRICACIÓN. (DEPOSITPHOTOS)</b>	12
<b>FIG. 3 ESQUEMA DEL MÉTODO DE SÍNTESIS ANODIZADO ELECTROQUÍMICO(LÓPEZ, 2015)</b>	13
<b>FIG. 4 VARIABLES DE CONTROL Y EFECTOS DE ESTAS EN LA MORFOLOGÍA DE LOS NANOTUBOS DE TITANIO.</b>	14
<b>FIG. 5 (A) MUESTRA LA VISTA EN SECCIÓN TRANSVERSAL DEL NANOCOMPUESTO DE QUITOSANO / NANOTUBOS DESPRENDIDOS DE LA SUPERFICIE DE LA ALEACIÓN, (B) MUESTRA LA COMPOSICIÓN ELEMENTAL, (C) Y (D) MUESTRA LOS NANOTUBOS FRACTURADOS (LÓPEZ PAVÓN L)</b>	15
<b>FIG. 6 CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS(LAFAYETTE W)</b>	17
<b>FIG. 7 INMOVILIZACIÓN DE GLUCOSA OXIDASA EN NANOTUBOS DE TITANIO.</b>	18
<b>FIG. 8 ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA ENZIMA BROMELINA(DRUGBANK)</b>	19
<b>FIG. 9 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA BROMELINA(KHALID, 2016)</b>	20
<b>FIG. 10 PELÍCULA POLIMÉRICA SOBRE NANOTUBOS(CIPRIANO, 2014)</b>	22
<b>FIG. 11 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA TÉCNICA DE ELECTROHILADO(SÁNCHEZ, 2013)</b>	23
<b>FIG. 12 MORFOLOGÍA DE NANOFIBRAS DE PVA (WWW.HINDAWI.COM)</b>	24
<b>FIG. 13 DESGLOSE DE LA METODOLOGÍA A SEGUIR.</b>	27
<b>FIG. 14 ESQUEMA SIMPLIFICADO DE LAS REACCIONES QUE OCURREN DURANTE EL PROCESO DE ANODIZADO(LÓPEZ, 2015)</b>	29
<b>FIG. 15 MÁQUINA UTILIZADA PARA REALIZAR DIP COATING</b>	30
<b>FIG. 16 PROCEDIMIENTO DEL METODO BRADFORD DONDE A) SE OBSERVAN LOS MATERIALES A UTILIZAR, B) SE AÑADE BRADFORD A UNA MUESTRA CON BROMELINA Y DESPUÉS DE UN TIEMPO CAMBIA DE COLOR, C) CARACTERIZACIÓN POR UV-VIS</b>	32
<b>FIG. 17 PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO CASEINOLÍTICO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA A) ADICIÓN DEL EDTA Y CISTEÍNA A LA MUESTRA CON ENZIMA B) MEZCLA SOBRE AGUA PARA MANTENER TEMPERATURA C) ADICIÓN DE LA CASEÍNA D) ADICIÓN DEL ÁCIDO TRICLOROACETICO E) CENTRIFUGADO</b>	33



<b>FIG. 18 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL HILADO SOBRE NANOTUBOS DESDE EL PROCESO DE</b> <b>A) MUESTRA DE TITANIO PULIDA, B) PROCESO DE ANODIZADO, C) MUESTRA</b> <b>ANODIZADA, D) ACERCAMIENTO DONDE SE DEMUESTRA LA PRESENCIA DE NANOTUBOS,</b> <b>E) ELECTROHILADO POLIMÉRICO SOBRE LA MATRIZ NANOESTRUCTURADA, F)</b> <b>RESULTADO FINAL DEL ELECTROHILADO SOBRE NANOTUBOS DE ALEACIÓN DE TITANIO</b> .....	35
<b>FIG. 19 MUESTRA ANODIZADA A 15V EN LA CUAL SE PUEDEN VER LOS NANOTUBOS ASÍ COMO</b> <b>LA CAPA SUPERFICIAL DE ELLOS EN DESPRENDIMIENTO</b> .....	36
<b>FIG. 20 MUESTRAS ANODIZADAS A 15V Y 25V ANTES Y DESPUÉS DE LIMPIEZA A) MUESTRA</b> <b>ANODIZADA A 15V ANTES DE LIMPIEZA B) MUESTRA ANODIZADA A 25V ANTES DE</b> <b>LIMPIEZA C) MUESTRA ANODIZADA A 15V DESPUÉS DE LIMPIEZA D) MUESTRA</b> <b>ANODIZADA A 25V DESPUÉS DE LIMPIEZA</b> .....	37
<b>FIG. 21 MUESTRA ANODIZADA A 25V EN LA CUAL SE PRESENTAN NANOTUBOS ALINEADOS Y</b> <b>SUS RESPECTIVAS MEDIDAS</b> .....	38
<b>FIG. 22 PERFIL DE LECTURA DE XPS EN EL CUAL SE OBSERVAN LOS PICOS</b> <b>CARACTERÍSTICOS DE LA ALEACIÓN LOS CUALES FUERON TOMADOS DE UNA MUESTRA</b> <b>RECIÉN ANODIZADA.</b> .....	39
<b>FIG. 23 RESULTADOS DE XPS DE UN ANÁLISIS DEL ELEMENTO OXIGENO EN EL CUAL SE</b> <b>ENCUENTRAN PRESENTES: ALEACIÓN SIN MODIFICAR (NEGRO), ALEACIÓN ANODIZADA</b> <b>(AZUL), ALEACIÓN ANODIZADA CON NANOFIBRAS EN LA SUPERFICIE (ROJO).</b> .....	40
<b>FIG. 24 PERFIL DE LIBERACIÓN ACUMULADO DE BSA MEDIDO EN PORCENTAJE EN UN</b> <b>PERIODO DE 12 HORAS</b> .....	41
<b>FIG. 25 PERFIL DE LIBERACIÓN ACUMULADO DE BROMELINA MEDIDO EN PORCENTAJE EN</b> <b>UN PERIODO DE 40 HORAS</b> .....	42
<b>FIG. 26 PERFIL DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN UN ENSAYO REALIZADO DURANTE 24 HORAS</b> .....	43
<b>FIG. 27 COMPARATIVA DE PORCENTAJE DE ENZIMA LIBERADO CONTRA ACTIVIDAD</b> <b>ENZIMÁTICA</b> .....	44
<b>FIG. 28 NANOFIBRAS SOBRE NANOTUBOS DOS FASES CONTIGUAS</b> .....	45
<b>FIG. 29 MICROGRAFÍA DE MEB DE UNA MUESTRA ANODIZADA A 25V Y ELECTROHILADA</b> <b>UTILIZANDO PVA A 8% COMO POLÍMERO A) 15S B) 30S C) 45S D) 60S E) 75S.</b> .....	46

<b>FIG. 30 CONJUNTO DE FASES METÁLICA/POLIMÉRICA A) CONJUNTO DE FASES NANOFIBRAS/ NANOTUBOS B) DESPRENDIMIENTO DE CAPA DE NANOTUBOS C) RED DE NANOFIBRAS RODEANDO LA CAPA DE NANOTUBOS .....</b>	<b>47</b>
--	-----------

## Resumen

El titanio es un metal el cual ha tenido gran impacto en la medicina, este ha sido utilizado en implantes ortopédicas así como en prótesis debido a que es inerte en el cuerpo, en los últimos años este material ha sido nanoestructurado en su forma de nanotubos, estos han sido probados anteriormente por nuestro grupo de trabajo en prótesis in vivo y han demostrado una optimización de propiedades, a su vez las enzimas han sido estudiadas más a fondo en los últimos años dando como resultado el descubrimiento de grandes propiedades útiles en la biomedicina. La enzima bromelina ha destacado debido a sus propiedades desinflamatorias, reductoras de tumores, así como anti cancerígenas, como resultado de lo anterior en este proyecto se plantea el uso de nanotubos de aleación de titanio ( $\text{Ti}_{24}\text{Zn}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$ ) como sistema de encapsulación y liberación de la enzima bromelina con posibles aplicaciones en el área biomédica.

## Introducción

En los últimos años la importancia de encontrar un dispositivo eficiente que esté funcionalizado como liberador de fármacos ha sido una parte crucial en la investigación biomédica, esto debido a la creciente demanda de tratamientos eficaces, rápidos y no invasivos para enfermedades comunes, crónicas y degenerativas que se presentan con mayor frecuencia debido al crecimiento exponencial de la población a nivel mundial.<sup>1-3</sup>

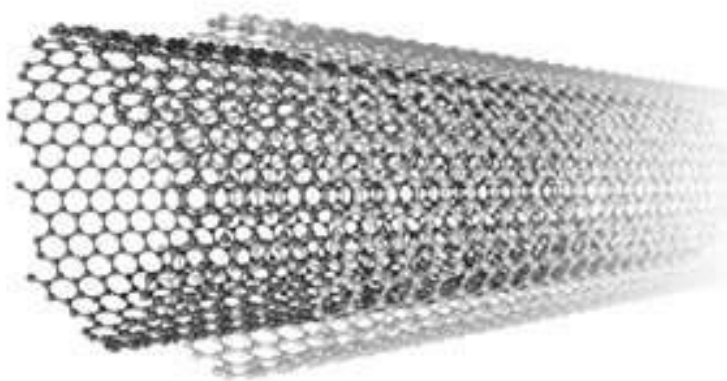
Uno de los métodos más frecuentemente buscados en la investigación biomédica ha sido la liberación de fármacos por diferentes medios.<sup>4-7</sup> Debido al auge de la nanotecnología se busca adaptar y optimizar diferentes métodos de liberación de fármacos, entre ellos el uso de nanotubos. Los nanotubos se han utilizado para optimización y funcionalización de materiales, así como en el área biomédica siendo portadores y liberadores de moléculas para uso terapéutico.<sup>8,9</sup> Las aleaciones de titanio han sido ampliamente utilizadas para la fabricación de prótesis articulares ortopédicas metálicas y cirugías de placas óseas esto debido a su alta resistencia y su biocompatibilidad.<sup>10-12</sup>

La bromelina ha sido estudiada en el ámbito médico debido a que muestra propiedades de regeneración ósea así como propiedades antiinflamatorias, reductoras de tumores y anticancerígenas las cuales han sido demostradas anteriormente.<sup>13,14</sup> En este trabajo de

investigación se pretende demostrar la eficacia de la enzima bromelina encapsulada en nanotubos de titanio como un método innovador en la liberación de la enzima bromelina.

## 1. Antecedentes

Los nanotubos son nanoestructuras las cuales se caracterizan principalmente por su forma cilíndrica y su gran relación área volumen como se observa en la figura 1.<sup>15</sup>



**Fig. 1 Nanotubo de carbono de pared múltiple** (*Posgradoeinvestigacion UADEC, s.f.*)

Este tipo de morfología es lo que ha permitido a los nanotubos ser utilizados en múltiples escenarios. Las propiedades de los nanotubos varían principalmente en el material del cual estén hechos, esto debido a que muchas de las propiedades fisicoquímicas de estos dependen del material.<sup>16</sup>

Algunos de los usos que se les ha dado a los nanotubos han sido en celdas solares, como fotocatalizadores, utilización en membranas y como liberadores de fármaco.<sup>17,18</sup> Por su parte las aleaciones de titanio han demostrado a lo largo de las últimas décadas características que les permiten interactuar de una manera eficiente con el cuerpo humano, este tipo de aleaciones han sido estudiadas y han demostrado biocompatibilidad en la superficie del material, esta es una de las principales razones por las cuales el titanio ha sido utilizado ampliamente en el área biomédica, más específicamente en prótesis articulares (Rodillas y cadera), prótesis dentales así como en liberación de medicamentos y stents.

## 1.1 Aleaciones de titanio y su uso en biomedicina

Las aleaciones de titanio constan de una mezcla de metales y otros elementos químicos. Al igual que todas las aleaciones estas se diseñan con la finalidad de mejorar considerablemente las propiedades físicas del material y que este pueda tener distintas aplicaciones.

Las aleaciones de titanio han sido ampliamente utilizadas para la fabricación de prótesis articulares ortopédicas metálicas y cirugías de placas óseas. Normalmente se fabrican a partir de piezas de barras forjadas o fundidas por CNC, CAD o por producción metalúrgica como se observa en la figura 2.

Un ejemplo de aleaciones que han sido utilizadas en biomedicina son:

- **Ti<sub>6</sub>Al<sub>7</sub>Nb**: Es una aleación de titanio de alta resistencia y con excelente biocompatibilidad utilizada en implantes quirúrgicos. Usado para reemplazar las articulaciones de cadera, ha estado en uso clínico desde principios de 1986.<sup>19</sup>



**Fig. 2** Prótesis articular de rodilla utilizando aleación de titanio para su fabricación. (*depositphotos, s.f.*)

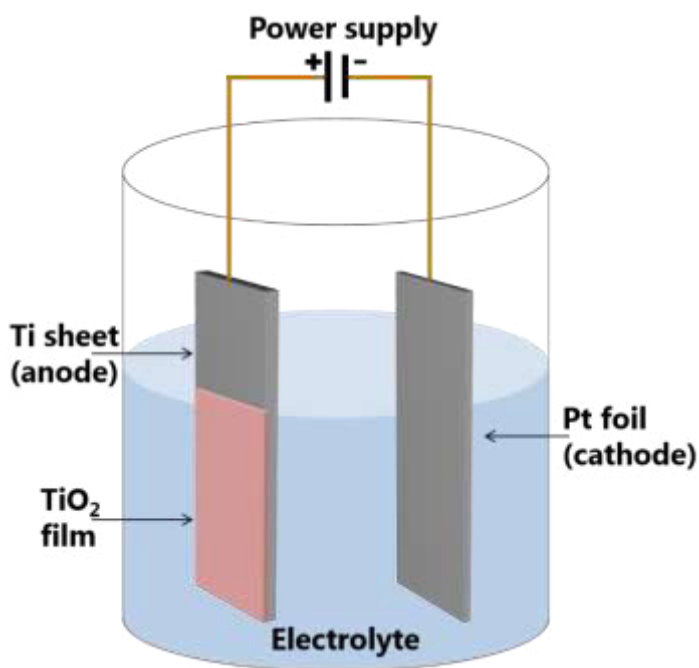
### 1.1.2 Nanotubos de titanio, síntesis y variables de control

Se denominan nanotubos a las estructuras tubulares (cilíndricas), cuyo tamaño se encuentra dentro de la escala nanométrica.<sup>20</sup> Los nanotubos han adquirido importancia en las investigaciones debido a sus múltiples propiedades entre ellas: propiedades electrónicas,

ópticas, mecánicas, térmicas, etc. las cuales, dependiendo el material en el que se encuentren pueden ser expresadas.

En los últimos años, la liberación de fármacos utilizando matrices compuestas por nanotubos ha sido un tema de gran interés a nivel mundial esto debido la demanda de la población por una mejor calidad de vida, al progreso en el conocimiento de nuevos fármacos y sobre todo al avance que la nanotecnología en conjunto con la biotecnología han presentado a lo largo de esta última década.<sup>17</sup>

Para lograr el objetivo de tener una óptima liberación de fármaco y así mismo presente la menor cantidad de inconvenientes al paciente, en los últimos años se ha investigado principalmente en el uso de matrices de nanotubos como portadores y liberadores de fármaco de titanio por presentar características físicas notables, así como biocompatibilidad e índices de toxicidad biológica bajos.<sup>21,22</sup>

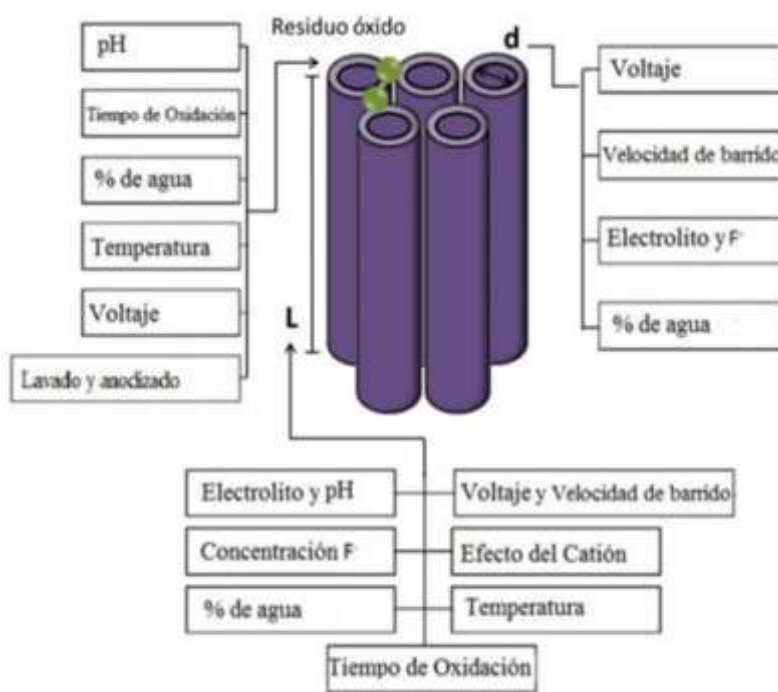


**Fig. 3 Esquema del método de síntesis anodizada electroquímica (LÓPEZ, 2015)**

Los nanotubos pueden ser sintetizados por distintos métodos, sin embargo el anodizado electroquímico es uno de los más utilizados, esto debido a la simplicidad del método así como a que esta técnica permite tener un control completo en la morfología final de los nanotubos, en la figura 3 podemos observar de manera gráfica las piezas que lo conforman.<sup>23</sup> Este método

consiste en la utilización de una corriente eléctrica la cual en combinación con un electrolito y un contraelectrodo inerte al electrolito los cuales fuerzan la oxidación de la fase más superficial de la muestra a anodizar lo cual produce una picadura en la superficie del material y a su vez promueve el crecimiento de nanoestructuras tubulares.<sup>24</sup>

Modificando las variables de control se pueden obtener distintas morfologías de nanotubos como se muestra en la figura 4.



**Fig. 4 Variables de control y efectos de estas en la morfología de los nanotubos de titanio.**

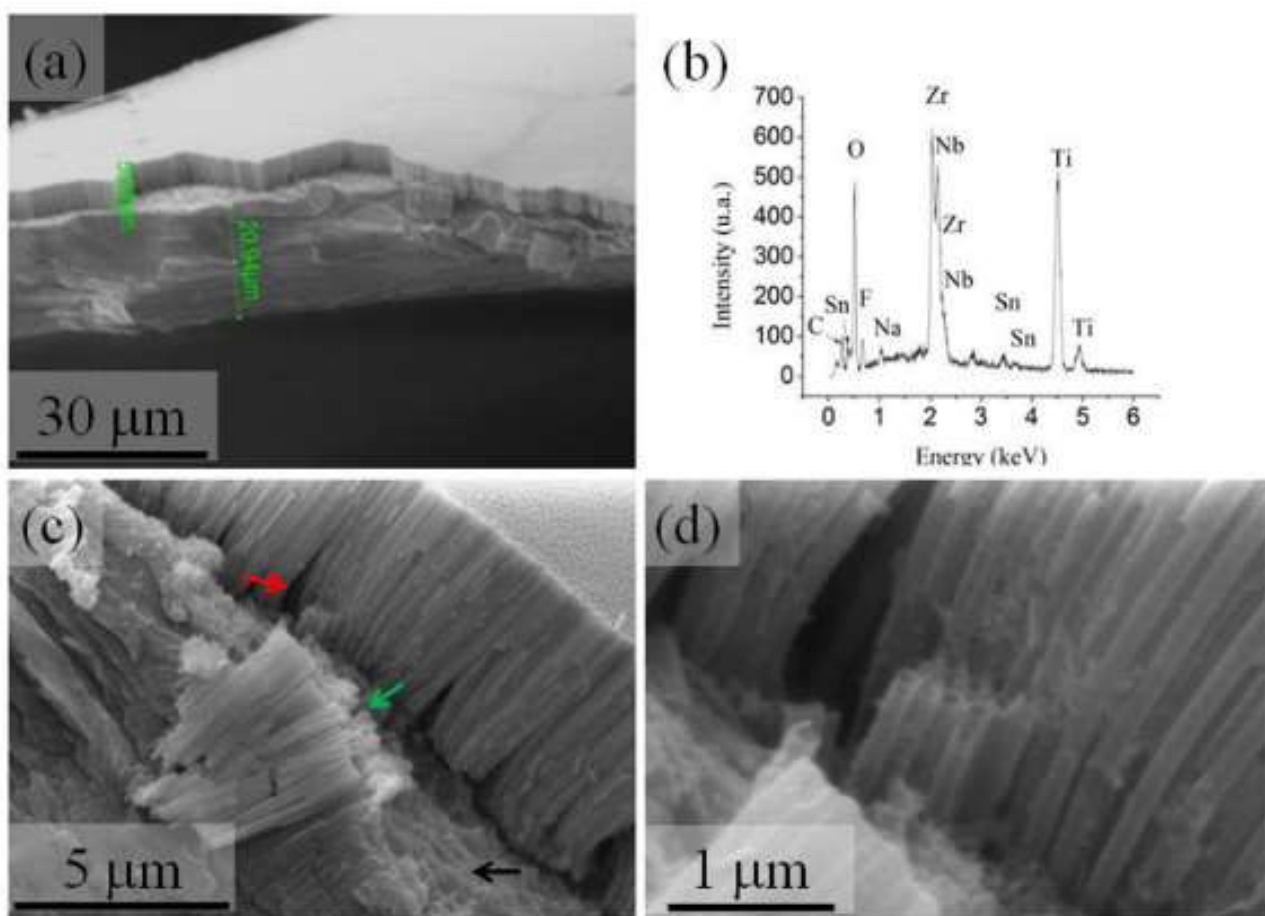
### 1.1.3 Aleación $\text{Ti}_{24}\text{Zn}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$

Gracias a las propiedades del titanio este se utiliza ampliamente en aleaciones, las cuales presentan propiedades interesantes, entre ellas las aleaciones base níquel destacan por su superelasticidad y su resistencia a la temperatura, sin embargo, el níquel presente en altas concentraciones se ha reportado como un potencial agente alérgico y carcinogénico en el cuerpo. Los iones níquel tienden a acumularse en las células afectando su metabolismo celular por ejemplo la síntesis en el ADN.

Como alternativa a las aleaciones base níquel se buscó una aleación la cual cumpliera con la función de tener una súper elasticidad comprobable similar a las aleaciones base níquel y además fuera similar a la elasticidad ósea, tomando esto en cuenta y distintas aleaciones las cuales presentaban ciertos niveles de

súper elasticidad se llegó a la aleación Ti24Zn10Nb2Sn, cuya superelasticidad se ha comprobado por nuestro grupo de investigación y fue explicado por la recrystalización en  $\{001\}$ ,  $\{110\}$ . Además esta aleación presenta excelentes propiedades de recuperación a la tensión cuando se aplican tratamientos térmicos alcanzando una recuperación de hasta el 7% lo cual es el doble que otras aleaciones libres de níquel.<sup>25</sup>

Esta aleación también ha sido de estudio en nuestro grupo de trabajo el cuál ha obtenido como resultados la fabricación de una película nanocompuesta las cuales se realizaron con la aleación Ti24Zn10Nb2Sn en conjunto a una película de quitosano y por medio de anodizado electroquímico de manera similar a lo que se propone en esta tesis, dando como resultado después de la evaporación del solvente una película combinada con nanotubos como se observa en la figura 5.<sup>23</sup>



**Fig. 5** (a) Muestra la vista en sección transversal del nanocompuesto de quitosano / nanotubos desprendidos de la superficie de la aleación, (b) muestra la composición elemental, (c) y (d) muestra los nanotubos fracturados (López Pavón L)



## 1.2 Enzimas

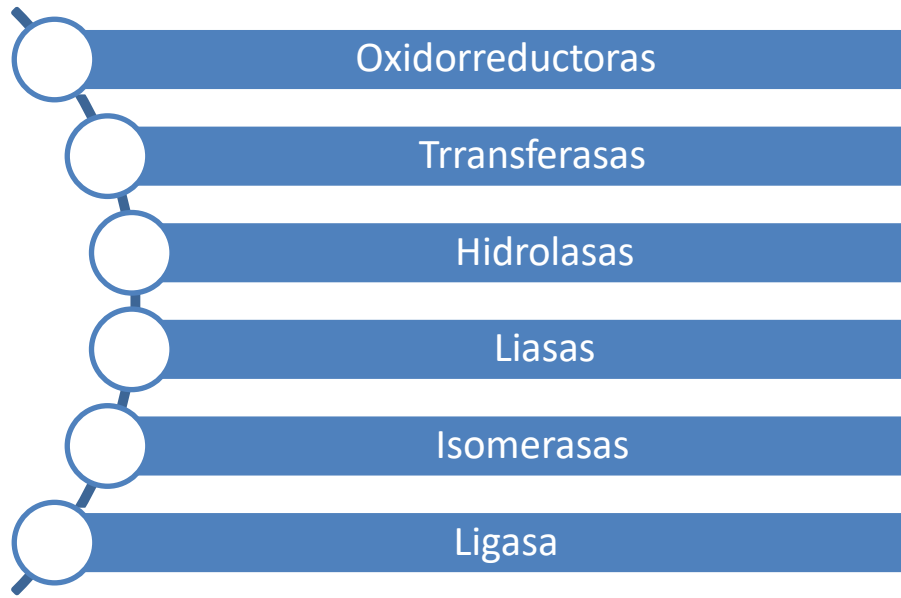
Las enzimas son una clase específica de las proteínas las cuales tienen como objetivo acelerar la velocidad de las reacciones químicas que ocurren dentro de una célula. De acuerdo a lo anterior se les conoce más ampliamente como catalizadores biológicos. Las enzimas tienen un papel fundamental ya que ayudan a los procesos esenciales tales como: La digestión de alimentos, el metabolismo, la coagulación sanguínea y la contracción muscular. El modo de acción es específico ya que cada tipo de enzima actúa sobre un tipo particular de reacción y sobre un sustrato específico, lo cual nos lleva a tener distintos tipos de clasificaciones de enzimas.<sup>26</sup>

Además de lo antes mencionado en la industria química son ampliamente utilizadas en la formulación o fabricación de productos de uso diario tales como: quitamanchas, detergentes, blanqueadores, lavavajillas, etc. Gracias a esto han adquirido una amplia aceptación en el mercado y su uso a su vez ha provocado una investigación en el uso de ellas.

### 1.2.1 Clases de enzimas

A continuación, se describe la clasificación de las enzimas así mismo se puede observar en la figura 6.

- ✓ **Oxidorreductoras:** Son las encargadas de la catalización de reacciones oxidorreductoras, por ejemplo, de la transferencia de hidrógeno (H) o electrones (e-) de un sustrato a otro, dependiendo la reacción en general
- ✓ **Trasnferasas:** Su función principal es la catálisis de la transferencia de un grupo químico (distinto del hidrógeno) de un sustrato a otro
- ✓ **Hidrolasas:** Principales catalizadoras de las reacciones de hidrólisis
- ✓ **Liasas:** Catalizan reacciones de ruptura o unión de sustratos
- ✓ **Isomerasas:** Catalizan reacciones de isómeros.
- ✓ **Ligasa:** Catalizan la unión de dos sustratos con hidrólisis simultánea de un nucleótido trifosfato (ATP, GTP, etc.)



**Fig. 6 Clasificación de las enzimas** (*Lafayette W*)

### **1.2.2 Propiedades de las enzimas como catalizadores naturales**

Las enzimas son catalizadores naturales biológicos esto ya que aceleran las reacciones multiplicando su velocidad en factores de  $10^6$  a  $10^{12}$  veces, las cuales transcurren bajo ciertas condiciones de temperatura, presión atmosférica y en un rango de valores de pH.

### **1.2.3 Importancia de la encapsulación enzimática**

La encapsulación enzimática es un proceso mediante el cual las enzimas se introducen en una matriz de un determinado material para impedir que pierdan su estructura tridimensional una vez que son extraídas de su medio ambiente natural. En otras palabras se puede decir que la encapsulación nos ayuda a poder mantener las propiedades de las enzimas bajo condiciones fisicoquímicas de un medio de reacción que en otras circunstancias serían nocivas para su funcionamiento.

La importancia de la encapsulación enzimática proviene principalmente de las ventajas obtenidas las cuales se dan a continuación:

- ✓ Dar protección al material activo de la degradación por el medio de reacción (Calor, luz solar, cambios de humedad, presión, aire, etc.)
- ✓ El material encapsulado tiene una liberación controlada

- ✓ Se puede modular las propiedades fisicoquímicas de las enzimas encapsuladas.
- ✓ La encapsulación de enzimas puede prevenir reacciones secundarias no requeridas.
- ✓ Estabiliza la estructura tridimensional de las enzimas bajo condiciones de pH y temperatura adversas.

### **1.3 Uso de enzimas en una matriz de nanotubos de titanio**

Las interacciones que existen entre nanotubos de titanio y enzimas han sido estudiadas con anterioridad para poder determinar la viabilidad de estos como modelo encapsulador de enzimas y la viabilidad de ser utilizados sin que estos dañen o modifiquen las enzimas.

El desarrollo de matrices de nanotubos de titanio en combinación con las enzimas ha sido utilizado principalmente para el desarrollo de biosensores en los cuales la enzima queda atrapada de manera permanente dentro de los nanotubos de titanio. Esto es posible ya que la estructura de los nanotubos de titanio es ideal para poder almacenar y mantener inmovilizadas las enzimas, esta inmovilización permite el mantener la estructura compleja de las enzimas aunado a que el titanio favorece la bioactividad de estas.<sup>27</sup>

El uso de nanotubos de titanio como parte esencial de la inmovilización enzimática ha sido demostrado utilizando diversas enzimas entre ellas la glucosa oxidasa y la peroxidasa de rábano picante además de proteínas como la BSA como se observa en la figura 7, así mismo se demostró que otro tipo de proteínas, así como enzimas de mayor importancia como el ARN son viables de inmovizar utilizando este tipo de matrices.<sup>27-29</sup>

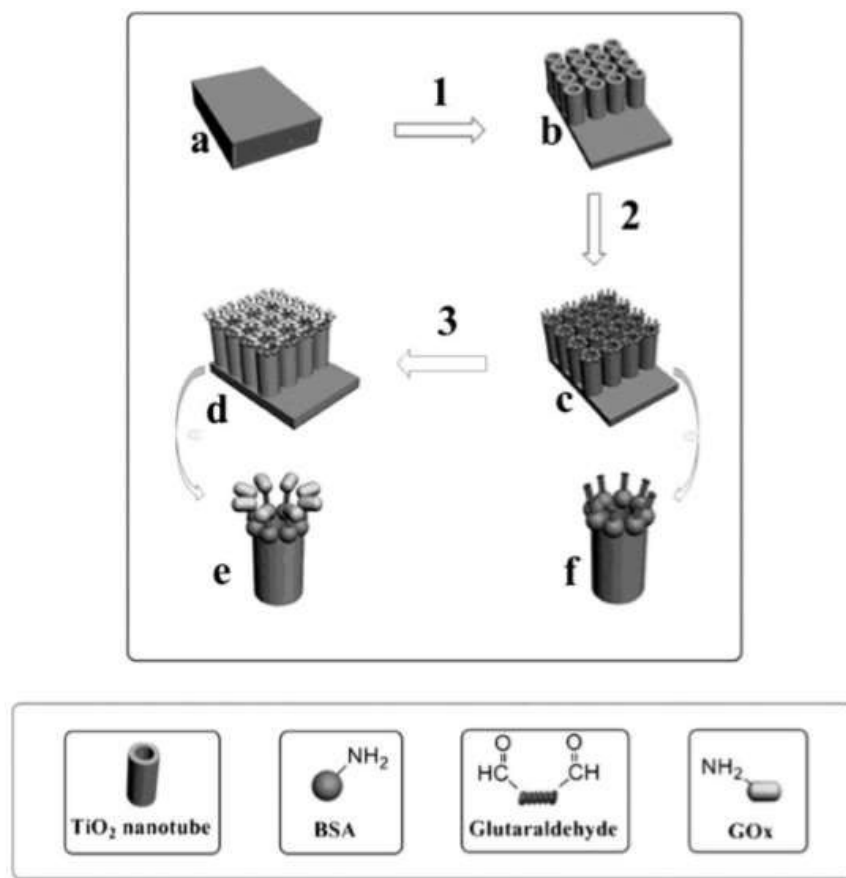


Fig. 7 Inmovilización de Glucosa Oxidasa en nanotubos de titanio (Tian, 2014)

## 1.4 Bromelina

La bromelina es una enzima de origen vegetal extraída de la piña y es utilizada a nivel industrial principalmente como ablandador de carne y en la fabricación de productos alimenticios como quesos, harinas y aclarador en cervezas al hidrolizar las proteínas solubles de esta.<sup>30</sup> En los últimos años esta enzima ha destacado debido a recientes investigaciones sobre su uso como potencial regenerador óseo y como un posible tratamiento de osteoartritis.

Al igual que la familia proteasa la bromelina presenta una forma tridimensional compleja la cual se puede observar en la figura 8, gracias a esta forma tridimensional esta enzima puede llevar a cabo su acción proteolítica.



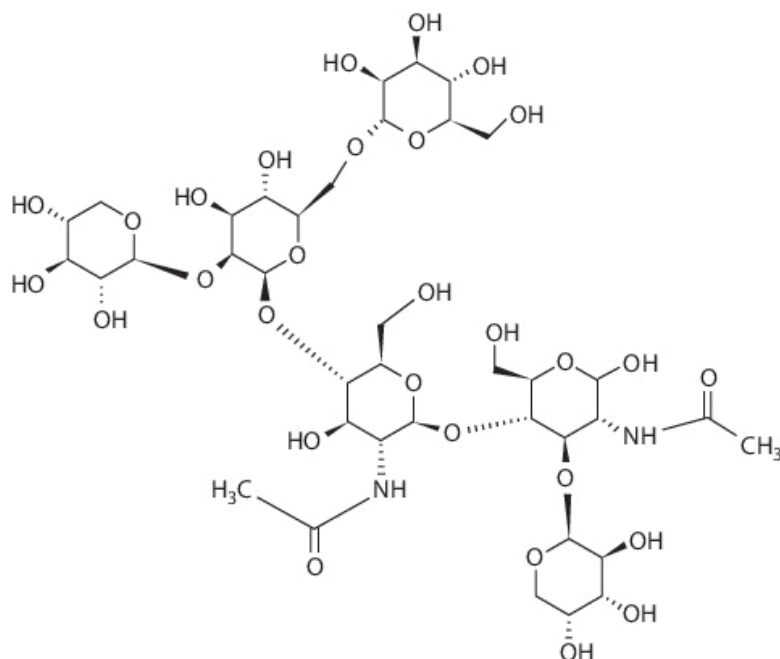
**Fig. 8 Estructura tridimensional de la enzima bromelina** (*Drugbank, s.f.*)

#### **1.4.1 Propiedades bioquímicas de la bromelina**

El extracto acuoso crudo del tallo y el fruto de la piña se conoce como bromelina. Es una mezcla de diferentes tiol endopeptidasas y otros componentes como fosfatasas, glucosidasa, peroxidasas, celulasas, glicoproteínas, carbohidratos y varios inhibidores de la proteasa. La actividad enzimática de la bromelina comprende un amplio espectro teniendo un rango de pH de 5.5 a 8.0 dentro de este rango la enzima puede funcionar de una manera correcta y sin presentar degradación. La bromelina se prepara a partir de jugo de piña refrigerado y esto se realiza por medio de las técnicas de centrifugación, ultrafiltración y liofilización.

El proceso de liofilización produce un polvo amarillento, cuya actividad enzimática se determina con diferentes sustratos tales como caseína (unidades de tirosina), gelatina (unidades de digestión de gelatina) o tripéptidos cromogénicos.

En la figura 9 podemos observar la estructura química de esta enzima, así como los grupos funcionales que esta posee.



**Fig. 9 Estructura química de la Bromelina** (Khalid, 2016)

#### 1.4.2 Usos biomédicos de la bromelina

La bromelina se ha utilizado en la biomedicina presentando distintas propiedades terapéuticas que potencializan el tratamiento de distintas enfermedades, principalmente aquellas relacionadas con los huesos. Esta enzima previene o minimiza la gravedad de la angina de pecho y el ataque isquémico transitorio. Es útil en la prevención y el tratamiento de la tromboflebitis. También puede descomponer las placas de colesterol y ejerce una potente actividad fibrinolítica. Una combinación de bromelina y otros nutrientes protegen contra la lesión por isquemia / reperfusión en el músculo esquelético.<sup>31</sup>

Aunado a lo anterior la bromelina ha tenido un papel importante en tratamientos relacionados a la osteoartritis ya que se le identifica como un complemento alimenticio que puede proporcionar un tratamiento alternativo al antiinflamatorio no esteroideo. Esta a su vez desempeña un papel importante en la patogenia de la artritis. La bromelina tiene propiedades analgésicas que se cree que son el resultado de su influencia directa sobre los mediadores del dolor como la bradicinina. Los primeros estudios informados que investigaron la bromelina fueron una serie de informes de casos de 28 pacientes con osteoartritis o artritis reumatoide moderada o grave.<sup>32</sup>

#### 1.4.3 Encapsulación de la bromelina

Dado a los beneficios de la bromelina que fueron descritos anteriormente y a la necesidad de poder mantener activa dicha enzima se han reportado distintos métodos en los cuales la bromelina ha sido encapsulada. Las nanoesferas han sido estudiadas como un método viable de encapsulación enzimática y se ha reportado que las proteasas incluyendo la bromelina pueden encapsularse en este medio dando como reacción un incremento en la estabilidad térmica.<sup>33</sup>

Así mismo en estudios reportados por Bernela et al. se ha reportado que la encapsulación por medio de nanopartículas en goma de katira favorece la propiedad anti inflamatoria de la bromelina encapsulada.<sup>34</sup>

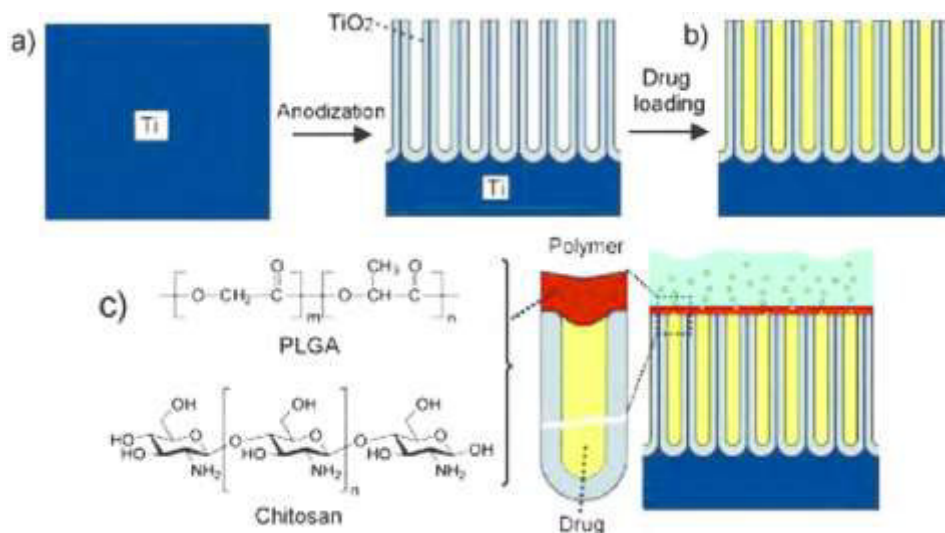
### **1.5 Control de liberación por medio de un recubrimiento polimérico**

Una limitación principal del uso del uso de nanotubos de aleación de titanio en aplicaciones de administración de fármacos es el efecto de liberación repentina o en otras palabras una liberación sin control en el que la mayor parte de la carga de fármaco se libera de la capa de nanotubos en los primeros minutos después de la interacción de la prótesis con el medio de liberación.

En este sentido las membranas de polímeros proporcionan un mejor control en el mejoramiento de la biocompatibilidad y para reducir el efecto de liberación de ráfagas para aplicaciones in vivo. Dado lo anterior, se ha informado sobre el uso de revestimientos de películas poliméricas en implantes de stents con el fin de retrasar la liberación del fármaco y así tener un efecto de liberación más controlada como se observa en la figura 10.<sup>17</sup>

Sin embargo, se ha informado que, durante el uso prolongado de estos stents, la degradación del polímero puede inducir una respuesta inflamatoria, activando los fagocitos y aumentando la proliferación del músculo liso vascular, lo que puede llevar al fracaso del implante.

Como alternativa, las nanofibras han sido muy utilizadas en diversas áreas de la biomedicina tales como biosensores, portadores de fármacos e ingeniería de tejidos, principalmente debido a su parecido con la matriz extracelular (MEC) y su gran relación área a volumen. Esta morfología nanofibrosa ha demostrado ser esencial en la función correcta de la estera de nanofibras en todas las aplicaciones de esta tecnología.<sup>35</sup>

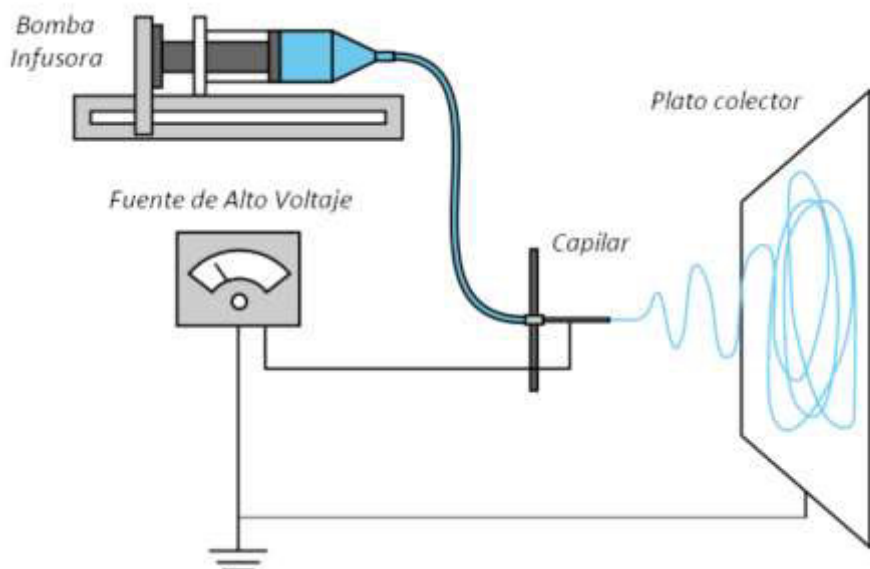


**Fig. 10 Película polimérica sobre nanotubos** (Cipriano, 2014)

## 1.6 Electrohilado

Las características básicas de la técnica del electrohilado se basan en un electrodo que es insertado en la solución polimérica y el otro electrodo al colector, el cual a su vez es conectado a tierra<sup>36</sup>. Cuando un alto voltaje es aplicado, la repulsión de cargas en la superficie del fluido provoca una fuerza directamente opuesta a la tensión superficial del fluido. Cuando el campo eléctrico se incrementa, la superficie semiesférica del fluido en la punta de la aguja del inyector se alarga hasta llegar a tomar una forma cónica llamado “cono de Taylor”. Un chorro de fluido cargado es despedido desde la punta del cono de Taylor, cuando la fuerza electrostática vence la tensión superficial en un valor crítico del campo eléctrico. Una característica observada durante este proceso es la salida aleatoria del chorro polimérico conocida como “whipping” como se observa en la figura 11.





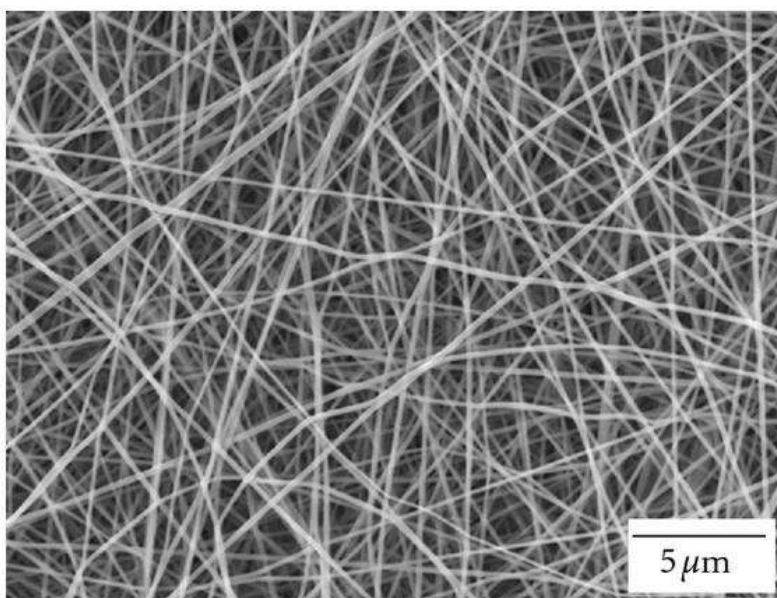
**Fig. 11 Representación gráfica de la técnica de electrohilado** (Sánchez, 2013)

La evaporación del solvente toma lugar desde las fibras poliméricas cargadas hasta el camino al colector produciendo sobre el colector una estera de fibras no entretejidas. Las principales ventajas de las nanofibras en comparación con las películas de polímeros son la alta relación área a volumen y la buena interacción de este tipo de nanoestructuras en presencia de biomoléculas debido a su parecido con el ECM.<sup>37</sup>

### **1.6.1 Membranas nanofibrosas poliméricas con potencial aplicación en el control de la liberación enzimática.**

Como alternativa a las películas poliméricas las nanofibras pueden jugar un rol muy importante en el control de la liberación enzimática. Las nanofibras son fibras con diámetros en el rango nanométrico que pueden obtenerse a partir de diferentes soluciones de polímeros mediante diferentes procesos de síntesis. Las nanofibras poliméricas han sido muy utilizadas en biomedicina como biosensores, portadores de fármacos e ingeniería de tejidos principalmente debido a su parecido con la matriz extracelular (MEC) y la gran relación área a volumen.<sup>38 39</sup> Esta morfología nanofibrosa se puede observar en la figura 12 y ha demostrado ser esencial en la función correcta de la estera de nanofibras en las diversas aplicaciones en donde ha sido utilizadas.

El electrohilado es la técnica más utilizada en la síntesis de nanofibras debido a su configuración simple y económica y su versatilidad en la modulación de las propiedades finales de las nanofibras.<sup>40</sup> En la figura 12 podemos observar un ejemplo de la morfología de nanofibras poliméricas de PVA.



**Fig. 12 Morfología de nanofibras de PVA** (*www.hindawi.com, s.f.*)

Las principales ventajas de las nanofibras en comparación con las películas de polímeros son la alta relación área a volumen y la buena interacción de este tipo de nanoestructuras en presencia de biomoléculas debido a su parecido previamente con el ECM. Es importante destacar que, de acuerdo con nuestra investigación bibliográfica, este es el primer informe sobre electrospinning sobre una aleación de titanio nanoestructurada en el área de liberación de medicamentos. Además, debido al parecido de matriz extracelular (ECM) de la estera de nanofibras, se espera que la biocompatibilidad de la prótesis de aleación de Ti y otras aplicaciones biológicas aumente exponencialmente y se optimice el rendimiento de la capa de material polimérico. Es importante destacar que la morfología de las nanoestructuras, ya sean NNTBS o nanofibras, afecta las propiedades intrínsecas de los materiales y su biocompatibilidad.<sup>41</sup>

## 2. Hipótesis

Es posible utilizar los nanotubos de una aleación de titanio ( $\text{Ti}_{24}\text{Zn}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$ ) como sistemas de encapsulación y liberación de la enzima bromelina.

## 3. Objetivo General

En base a la técnica de anodizado se sintetizarán nanotubos de la aleación  $\text{Ti}_{24}\text{Zn}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$ , los cuales se pretende utilizar como sistema de encapsulación y liberación de la enzima bromelina, esto con el fin de crear una plataforma de liberación con potenciales aplicaciones terapéuticas.

## 4. Objetivos Específicos

- Sintetizar nanotubos de titanio utilizando la técnica de anodizado a partir de la aleación  $\text{Ti}_{24}\text{Zn}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$ .
- Optimizar las condiciones de síntesis de nanotubos para llegar a la morfología óptima para el proceso de liberación.
- Caracterizar morfología y presencia de los nanotubos.
- Utilizar la enzima Albumina de Suero Bovino (BSA) como proteína de pruebas para establecer condiciones óptimas de encapsulación en nanotubos
- Encapsular la enzima bromelina en los nanotubos mediante el proceso de dip coating
- Caracterizar la presencia de la enzima, así como su posterior liberación
- Establecer y optimizar la metodología para la medición de la actividad enzimática de la enzima bromelina en solución.
- Mediante técnicas de caracterización lograr determinar la presencia y funcionalidad de nanotubos de titanio, así como de la enzima.
- Utilizar nanofibras como método de modulación y liberación de la enzima encapsulada en los nanotubos de titanio.

## 5. Materiales y reactivos

Fluoruro de Amonio marca Jamelk N° A5095-05, Sulfato de amonio marca Jamelk N° A5725-05, placa de aleación de titanio ( $\text{Ti}_{24}\text{Zr}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$ ), caimanes eléctricos, Electrodo en rejilla de platino, Bromelina (Steam bromelain)  $\geq 3$  unidades/mg Sigma Aldrich Numero EC 3.4.22.32, Poli (vinil alcohol) (PVA) con 87-89% hidrolizado y un peso molecular promedio en (Mw) de 13-23 kg/mol, Poli (vinil alcohol) (PVA) de medio peso en (Mw) 13 kg/mol 99+%

hidrolizado, , tirosina y ácido tricloroacético, ácido acético grado reactivo ACS  $\geq 99.7\%$ , Fosfato de potasio dibásico grado reactivo ACS  $\geq 98\%$  (P.M. 174.18), albúmina de suero bovino (BSA) polvo liofilizado  $\geq 96\%$ , ensayo proteínico Bradford/Bio-Rad reactivo colorante,

## **6. Equipos utilizados**

Microscopio electrónico de barrido (MEB) modelo FEI Nova Nano Sem Model 200, espectrofotómetro de ultravioleta-visible (UV/Vis) modelo Perkin Elmer Lambda UV 35, fuente de alto voltaje de corriente directa marca Gamma, bomba de inyección marca New Era PumpSystems, Modelo No. NE-300, Fuente de voltaje marca BK Precisión, Equipo Dip-Coating, XPS Escalab 250Xi.

## **7. Metodología**

La metodología general del proyecto se basa en cinco puntos principales los cuales son: La síntesis de nanotubos de aleación de titanio por medio de la técnica de anodizado electroquímico, ensayos de encapsulación con la enzima estándar de pruebas BSA en los nanotubos previamente sintetizados, encapsulación de la enzima bromelina en los nanotubos de aleación de titanio para su posterior liberación en medio acuoso, pruebas de actividad enzimática para determinar el estado de la enzima a lo largo del tiempo de liberación y caracterización de todas las pruebas por medio de SEM, UV-VIS y XPS.

Aunado a eso dentro de la metodología se abarca el uso de métodos tales como Bradford como ensayo colorimétrico de la presencia de la enzima, así como el método caseinolítico el cual permite determinar la actividad enzimática.

En la figura 13 podemos observar un gráfico que describe la metodología completa que se siguió desde la experimentación hasta la interpretación de resultados.

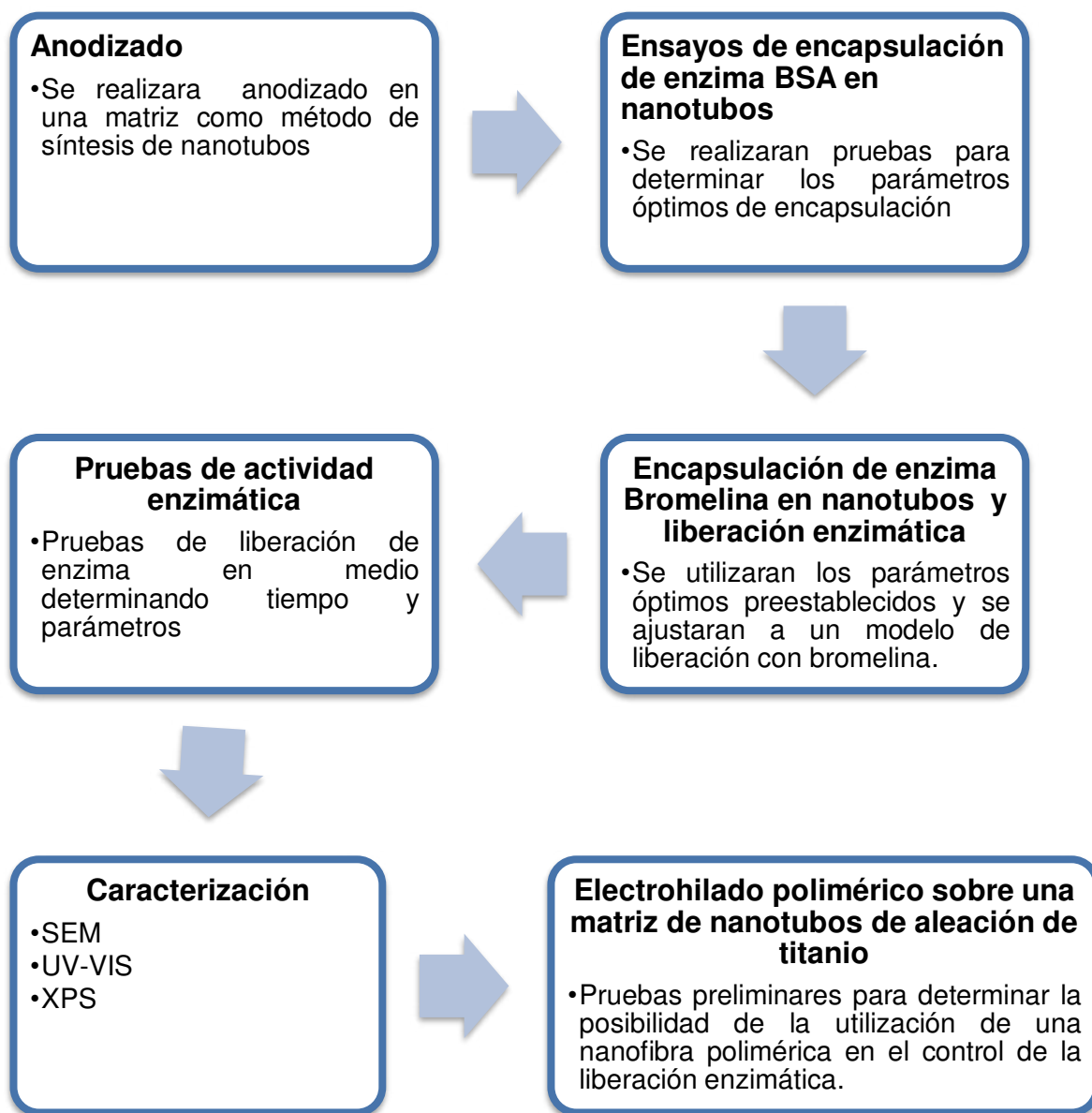


Fig. 13 Desglose de la metodología a seguir

### 7.1 Síntesis de nanotubos de aleación de titanio por anodizado electroquímico

El proceso electroquímico se utiliza para modificar la morfología superficial de un sustrato a partir de la oxidación-disolución de una capa de óxido sobre la muestra de interés.<sup>42</sup> Este método de síntesis es utilizado debido al control de variables que ofrece el cual nos permite tener como producto final nanotubos de aleación de titanio con una forma definida y controlada. Este método consiste en la purificación superficial de una muestra de aleación de titanio. Se tomó una muestra de titanio de un centímetro por un centímetro la cual fue sometida a un

decapado químico por un periodo de 5 segundos, posteriormente se limpió con etanol para eliminar los residuos químicos.

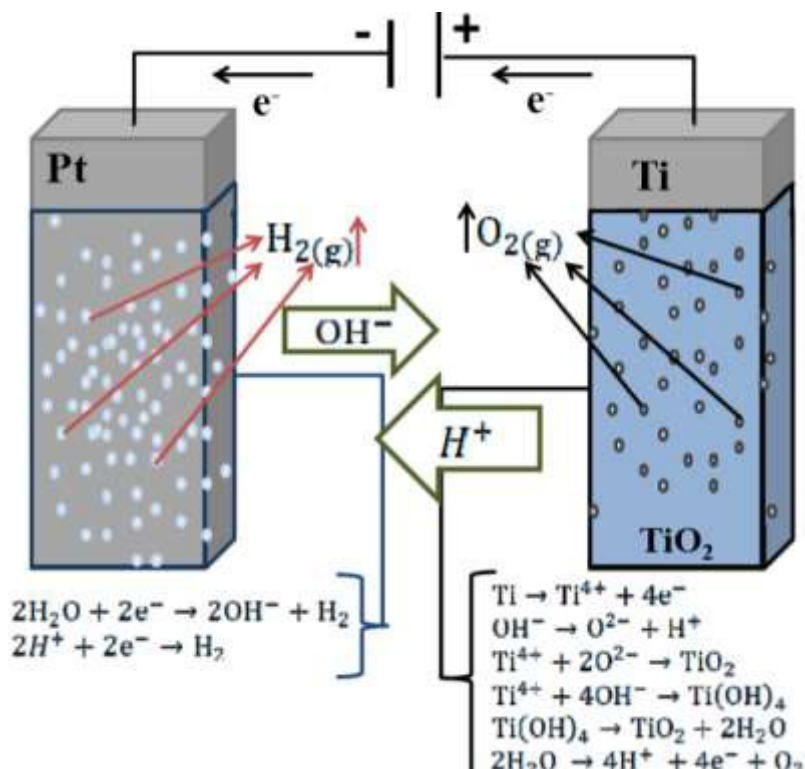
Seguido a lo anterior la muestra fue lijada hasta mostrar un color gris claro opaco uniforme a lo cual se le dio un tratamiento de pulido con acabado espejo para dejar la superficie de la muestra completamente uniforme. A continuación se procedió a someter la muestra al anodizado electroquímico, para esto se utilizaron 80 mL de electrolito  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 0.25 \text{ M NH}_4\text{F}$  para poder hacer que la reacción tuviera efecto, además como contra electrodo se utilizó una rejilla de platino.

Una vez que se tuvieron listas las muestras y el lugar para hacer la reacción, se procedió a poner la muestra de aleación de titanio frente al contra electrodo a una distancia de 2.5 cm, los valores de voltaje fueron variaron en una escala de 15 volts a 25 volts con intervalos de 5 volts por anodizado, el amperaje utilizado para todas las muestras fue de un Amper y el tiempo de anodizado fue de 30 minutos. Una vez obtenidas las muestras éstas fueron sometidas a un tratamiento de limpieza el cual consistía en dejarlas en sonicación por 10 segundos en una mezcla de agua etanol 50:50 para así eliminar las sales y residuos producidos por el método antes hablado.

### **7.1.1 Química del anodizado electroquímico.**

Químicamente hablando lo que sucede durante el proceso de anodizado electroquímico es lo siguiente<sup>43</sup>:

1. La capa de óxido de Titanio es producida por la reacción de oxidación en el ánodo dando como resultado iones  $\text{Ti}^{4+}$  y una desprotonación de hidroxilos
2. En este caso los iones de F presentes en la concentración del electrolito reaccionan con  $\text{TiO}_2$  formando fracturas
3. Se empiezan a formar poros en la superficie de  $\text{TiO}_2$
4. Empieza la formación de los Nanotubos de  $\text{TiO}_2$ .



**Fig. 14** Esquema simplificado de las reacciones que ocurren durante el proceso de anodizado (LÓPEZ, 2015)

El proceso se puede ver resumido en la figura 14 y este sucede hasta que la película de óxido alcanza un espesor crítico que vuelve el proceso de oxidación más lento, hasta que este finalmente cesa cuando el aumento de la resistencia eléctrica de la capa impide el flujo de electrones.

## 7.2 Encapsulación enzimática

Como ya se ha descrito anteriormente la encapsulación de proteínas, así como la encapsulación enzimática apoya para que estas mantengan su estructura compleja por un mayor tiempo además de promover un medio en el cual estas puedan viajar por el cuerpo con la menor degradación posible.

### 7.2.1 Encapsulación de Albumina de Suero Bobino (BSA)

Encapsulación de proteína de pruebas BSA en nanotubos de aleación de titanio: La proteína de prueba es la BSA, la cual se utilizó para poder determinar los parámetros de encapsulación enzimática óptimos en los nanotubos de titanio sin tener que hacer uso de un reactivo mucho más caro como lo es la enzima. Además, se utilizó para observar los efectos de las proteínas sobre matrices nanoestructuradas de aleación de titanio.

La enzima BSA fue preparada en una concentración de un miligramo por mililitro utilizando un buffer PBS a un pH de 8, esta mezcla se dejó en agitación constante a 180 rpm por media hora hasta que la mezcla se homogeneizó. Estas condiciones fueron elegidas debido a la similitud de las condiciones de trabajo de la enzima bromelina acorde a la literatura sobre el tema, además de que estas condiciones óptimas se encuentran dentro del rango de condiciones de funcionamiento de la enzima bromelina.

### **7.3 Método de carga para la encapsulación enzimática**

Para la realización de la carga enzimática de la bromelina, así como de la proteína de prueba BSA en los nanotubos de aleación de titanio se utilizó la técnica de dip coating (autoensamblaje). Para cargar la enzima se cargó un programa en el cual se tomó en cuenta el tiempo de descenso, la exposición de la matriz de nanotubos en la solución y su posterior secado en la máquina la cual se muestra en la figura 15.



**Fig. 15 Máquina utilizada para realizar Dip Coating**



Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- Se fija por medio de un sujetador la muestra a cargar.
- Se pone un vaso con suficiente solución enzimática para que al bajar el brazo se cubra por completo la muestra.
- Los parámetros a seguir toman como referencia la carrera completa de la máquina y el tamaño de muestra
- Se realizan un total de 24 ciclos en 24 horas

#### **7.4 Preparación de buffer de fosfato PBS**

La preparación del buffer de fosfatos a pH 8 fue de la siguiente manera: se pesaron 37.98 mg de ácido y 299.74 mg de base ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  fosfato monobásico de potasio como ácido) y ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  Fosfato dipotásico como base) estos se mezclaron en agua desionizada y se pusieron en agitación constante por un periodo de 1 hora a temperatura ambiente hasta que la mezcla se observó completamente homogeneizada.

Para la medición del PH del buffer se tomaron tres muestras de buffer y se midieron por medio de tiras medidoras de PH marca Macherrery-Nagel posteriormente se comprobó utilizando tres muestras distintas del mismo buffer las cuales se midieron con ayuda de un PH metro.

Encapsulación de encima de Bromelina en nanotubos de aleación de titanio:

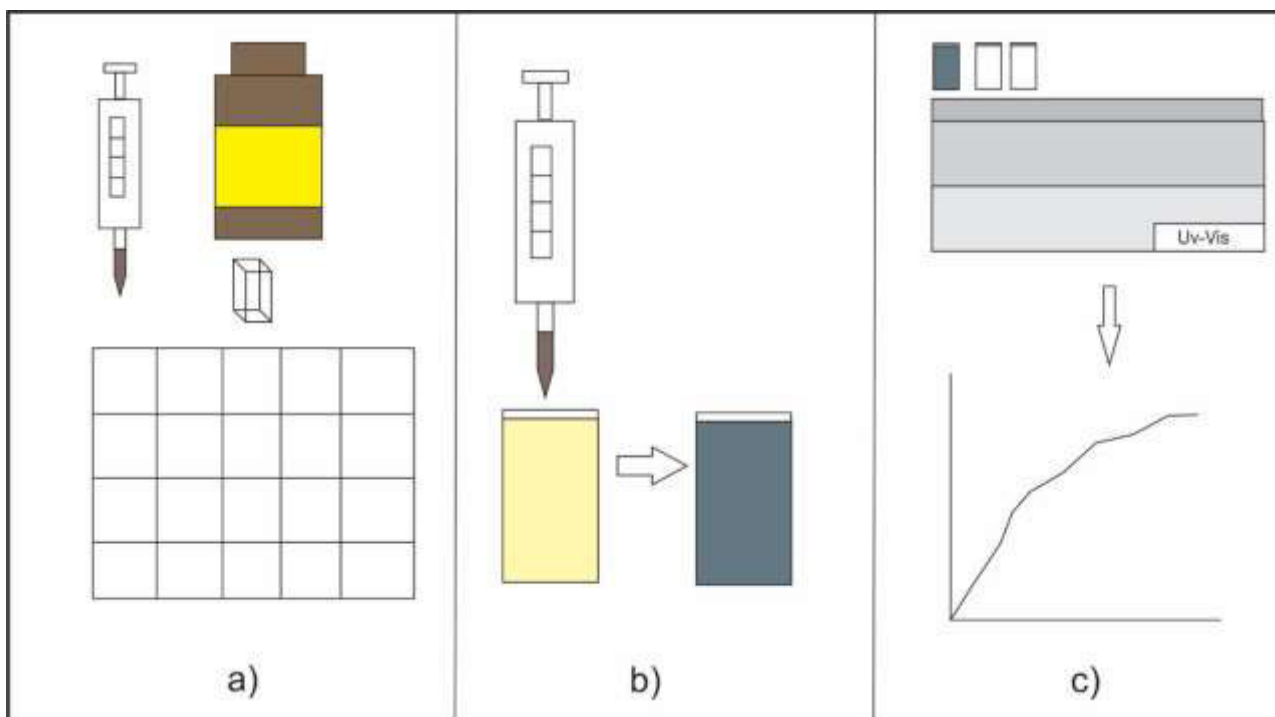
La enzima bromelina fue encapsulada por medio de la técnica de dip coating sobre una matriz de nanotubos de titanio, además se utilizó para observar los efectos de las enzimas sobre matrices nanoestructuradas de aleación de titanio.

La enzima Bromelina fue preparada en solución utilizando como precursores bromelina (stem bromelain) en polvo solubilizándola en buffer de fosfatos PBS pH 8 en una concentración de un miligramo por mililitro; Las condiciones anteriores fueron utilizadas debido a que fueron reportados en la literatura como dentro del rango óptimo de actividad para así conservar la enzima por un tiempo más prolongado.<sup>44,45</sup>

#### **7.5 Método Bradford**

El ensayo de Bradford, un ensayo de proteína colorimétrica, se basa en un cambio de absorbancia del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 el cual cambia su tonalidad en presencia de proteínas.

El colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 existe en tres formas: aniónica (azul), neutral (verde) y catiónica (roja). En condiciones ácidas, la forma roja del tinte se convierte en su forma azul, uniéndose a la proteína que se está ensayando. Si no hay proteínas para unir, entonces la solución permanecerá marrón. El colorante forma un complejo fuerte y no covalente con el grupo carboxilo de la proteína por la fuerza de Van der Waals y el grupo amino a través de interacciones electrostáticas. La unión de la proteína estabiliza la forma azul del colorante; por lo tanto, la cantidad del complejo presente en solución es una medida de la concentración de proteína, y se puede estimar mediante el uso de una lectura de absorbancia como se observa en la figura 16.<sup>46</sup>



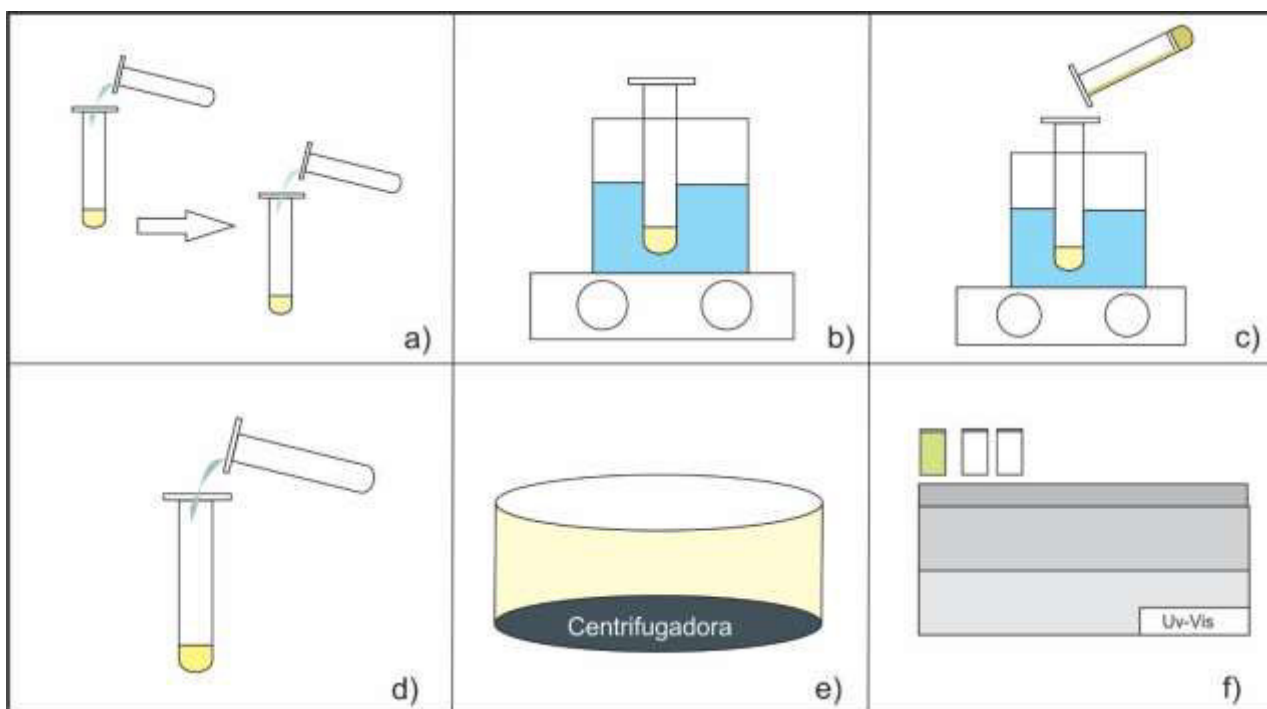
**Fig. 16 Procedimiento del método Bradford** donde a) Se observan los materiales a utilizar, b) Se añade Bradford a una muestra con bromelina y después de un tiempo cambia de color, c) Caracterización por UV-vis

## 7.6 Actividad enzimática

La evaluación de la actividad de la bromelina se realizó mediante el procedimiento caseinolítico en el cual se puede ver gráficamente en la figura 17.

Para la realización de este método se tomaron 3mL de muestra y se pusieron en un tubo de ensayo con 1.0 mL de buffer de fosfato 0.05 M con un pH de 8.0. Posteriormente se añadieron 2.0 mL de PBS 0.01 M conteniendo 2 mM de EDTA y 5 mM de cisteína. La mezcla de reacción se puso en un baño de agua a 35 °C por 5 minutos, esto con la finalidad de activar la enzima, en este paso se reducen los enlaces disulfuro de la cisteína del centro activo. Una vez que pasaron los 5 minutos se añadió 1 mL de caseína al 2 % peso/volumen. La mezcla se dejó en reacción por 20 minutos en un baño de agua a 35 °C en agitación. Posteriormente se añadió 1 mL de ácido tricloroacético al 15 % peso/volumen para detener la reacción. Al añadir el ácido tricloroacético la reacción se detuvo formándose un precipitado, se centrifugó a 9000 rpm por 30 minutos para separar la parte soluble del sólido obtenido.<sup>47</sup>

En la parte soluble de la mezcla de reacción se produjo la tirosina, la concentración de la tirosina se evaluó obteniendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro UV-visible, posteriormente la absorbancia se relacionó con el coeficiente extinción molar, usando la ecuación de la ley de Lambert-Beer.



**Fig. 17 Procedimiento del método caseinolítico para medir la actividad enzimática a) Adición del EDTA y Cisteína a la muestra con enzima b) Mezcla sobre agua para mantener temperatura c) Adición de la**

caseína d) Adición del ácido tricloroacético e) Centrifugado f) Medición de absorbancia por medio de UV-Vis

### 7.6.1 Disoluciones utilizadas para medición de la actividad enzimática

Para poder medir de manera correcta la liberación enzimática se utilizaron las siguientes disoluciones:<sup>47</sup>

- Disolución de ácido tricloroacético: Se pesaron 7.5 g de ácido tricloroacético, se disolvieron con H<sub>2</sub>O desionizada a 40 °C y posteriormente se aforaron a 50 mL para obtener una disolución al 15 % peso/volumen.
- Disolución de caseína: Se pesaron 2 g de caseína y se disolvieron en agua desionizada y 20 gotas de NaOH 1 M, calentando a 40 °C, después se aforó a 100 mL con agua desionizada.
- Disolución de cisteína-EDTA: Se pesaron 0.0585 g de cisteína y 0.0606 g de EDTA y se disolvieron en PBS pH 8 0.01 M calentando a 40 °C, después se aforó a 100 mL.

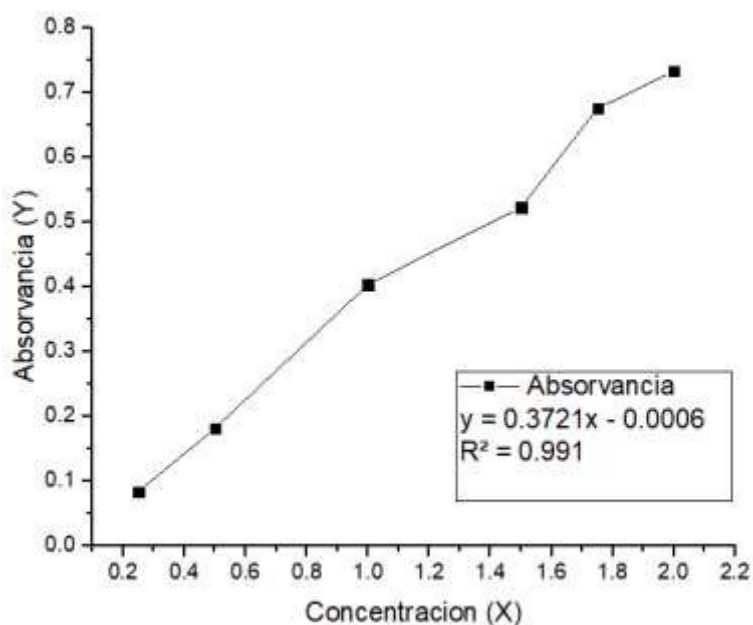
### 7.7 Liberación enzimática y cálculos de liberación

La liberación enzimática se realizó de la siguiente manera:

1. Se sumerge completamente la matriz de nanotubos ya cargada con enzima en 3 mL de buffer PBS pH8.
2. Se toma una alícuota de la solución de 100 µL como muestra cada hora y estas se ponían en celdas para su posterior medición.
3. Posteriormente se agregan 100 µL de buffer pbs para recuperar el volumen extraído y así poder mantener la concentración.
4. Una vez extraídas las muestras a estas se le agrega 1 ml de ensayo Bradford para cada una de las muestras y se deja en reposo entre 5 a 10 min
5. Ya que las muestras pasaron el tiempo de reacción se llevan a medición por medio de UV-VIS a para realizar su correspondiente lectura a 595 nm.<sup>48</sup>

Para realizar los cálculos de la liberación enzimática se utilizó una curva de calibración de la bromelina a partir del método Bradford antes descrito <sup>46</sup>.

Para la realización de la curva de calibración se propusieron valores de concentración de 2 mg/ml hasta 0.25 mg/ml de bromelina solubilizada en PBS y se midió la absorbancia para así poder realizar en base a la ecuación de la curva obtenida una comparación con los valores de absorbancia obtenidos al momento de realizar la medición de la liberación.



**Fig. 18 Curva de calibración de la enzima Bromelina en solución.**

En la figura 18 podemos observar la curva de calibración de la enzima bromelina de la cual se obtuvo una desviación estándar de 0.991 y un factor de correlación de 0.995 como se observa en la tabla 1, una vez obtenida esta curva se obtuvo la ecuación de los valores utilizados en la gráfica la cual se puede apreciar en la figura 18. La ecuación que describe la gráfica obtenida se despejó y se utilizó para poder convertir las absorbancias obtenidas a valores de concentración y a su vez a unidades de tirosina.

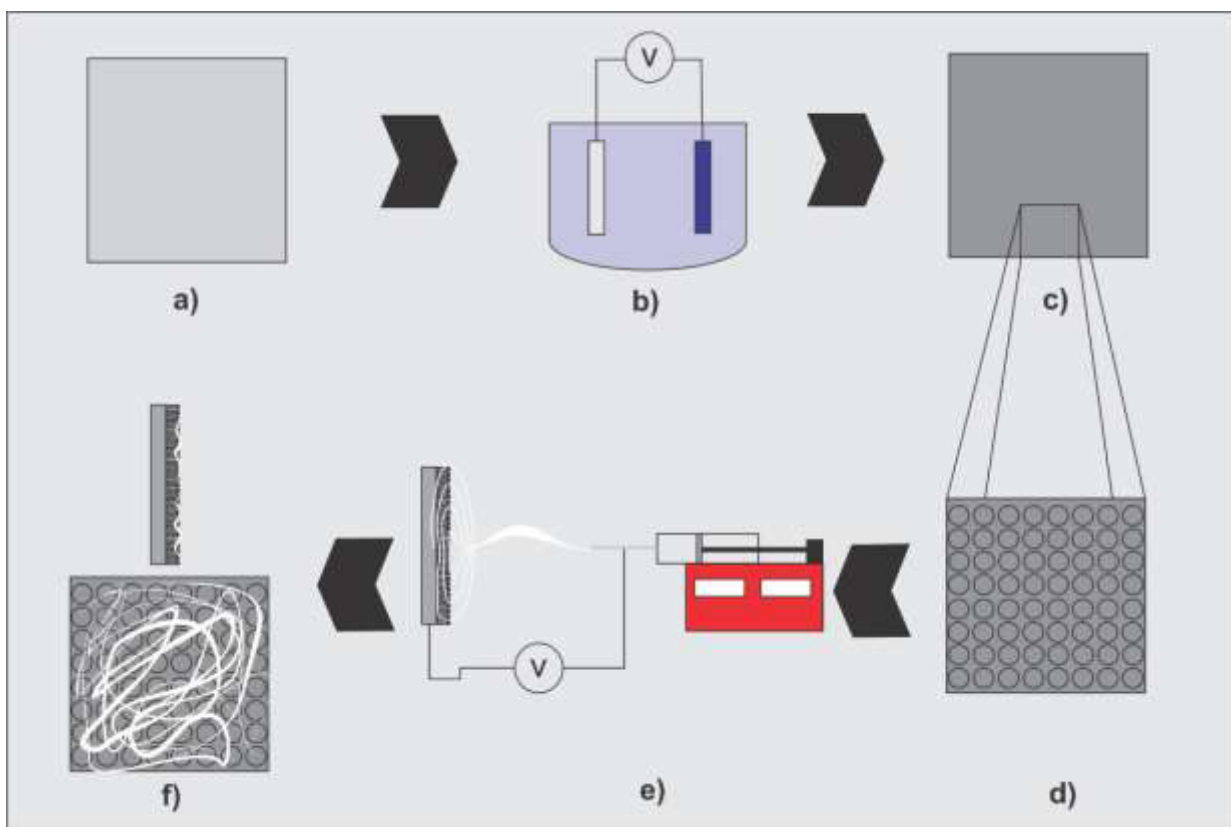
**Tabla 1**

*Factor de correlación en la curva de calibración de la enzima bromelina*

Factor de correlación	
	Concentración Absorbancia
Concentración	1
Absorbancia	0.995514623 1

## 7.8 Electrohilado sobre nanotubos

El montaje para la ejecución de la técnica de electrohilado, consta de un capilar a través del cual debe ser expulsada la solución polimérica (aguja, cono, etc.); una fuente de alto voltaje que posee dos electrodos, los cuales deben conectarse uno (positivo) al lugar de salida de la solución y otro (negativo) directamente al plato colector aterrizado (lámina de aleación de titanio nanoestructurada con nanotubos de la misma aleación con un área superficial de  $1\text{ cm}^2$ ) donde se depositarán las nanofibras después de la evaporación del disolvente. La bomba de infusión se utilizó para liberar la solución de PVA con una concentración determinada de enzima a un flujo constante de  $0.65\text{ ml/h}$  utilizando una corriente de  $15\text{ kV}$ , utilizando una distancia de  $8\text{ cm}$  entre la aguja y el colector metálico. El procedimiento de electrohilado mencionado se puede observar a detalle en la figura 19.



**Fig. 19 Representación gráfica del hilado sobre nanotubos desde el proceso de a) Muestra de titanio pulido, b) Proceso de anodizado, c) Muestra anodizada, d) Acercamiento donde se demuestra la presencia de nanotubos, e) Electrohilado polimérico sobre la matriz nanoestructurada, f) Resultado final del electrohilado sobre nanotubos de aleación de titanio**

## 7.9 Medición de nanofibras y nanotubos.

Para poder realizar las mediciones del diámetro de las nanofibras electrohiladas así como de los nanotubos de la aleación de Ti durante la experimentación se utilizó el software Fiji app al cuál se le adicionó un plugin que permite la medición de imágenes por medio de una comparación o línea guía y transformando los pixeles de la imagen a unidades de medición (micrómetros).

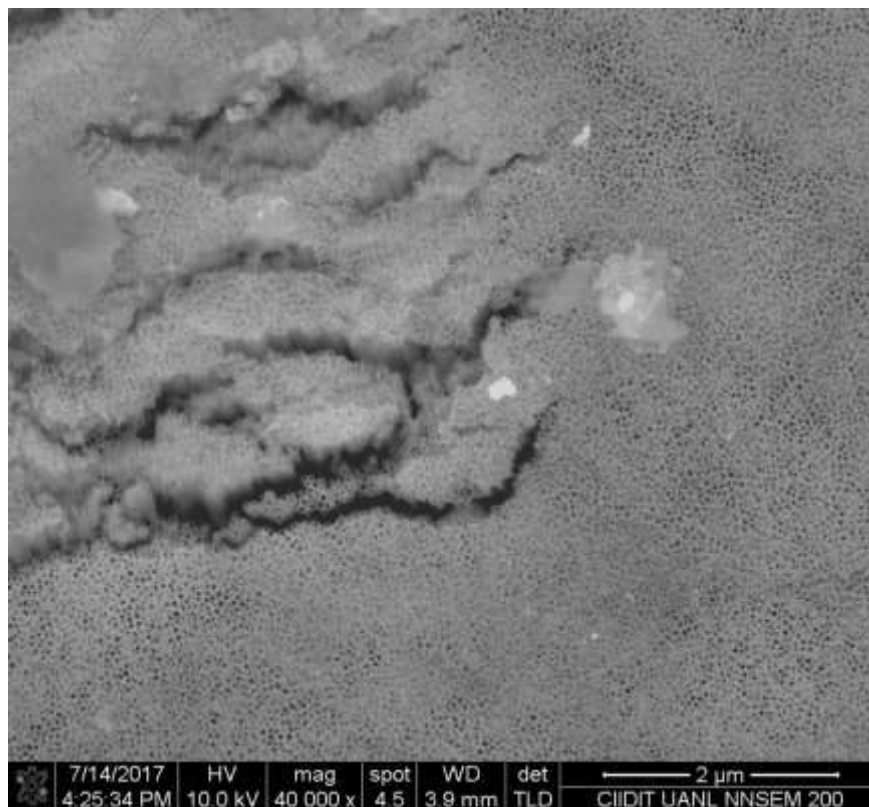
Al poder generar distintas mediciones se pudo trabajar con los datos para poder tener una mejor noción de los elementos a trabajar, así como de los resultados.

## **8. Resultados y discusión**

Tomando en cuenta los puntos anteriores se procedió a efectuar la experimentación correspondiente en la cual se obtuvieron los siguientes resultados:

### **8.1 Análisis morfológico de los nanotubos de titanio**

Se analizaron las muestras de titanio anodizado por medio de MEB (Microscopio electrónico de barrido). En el análisis correspondiente de las micrografías resultantes se pudo observar que a partir de una muestra de aleación de titanio y llevando a cabo la síntesis por medio de anodizado electroquímico existe un crecimiento uniforme en toda el área superficial de estructuras tubulares tal y como se observa en la figura 20. Estas estructuras están reportadas de acuerdo a la literatura como nanotubos de titanio ya que su diámetro se encuentra dentro del rango nanométrico y estas fueron sintetizadas a partir de aleación de titanio.<sup>15</sup>



**Fig. 20 Muestra anodizada a 15v en la cual se pueden ver los nanotubos así como la capa superficial de ellos en desprendimiento**

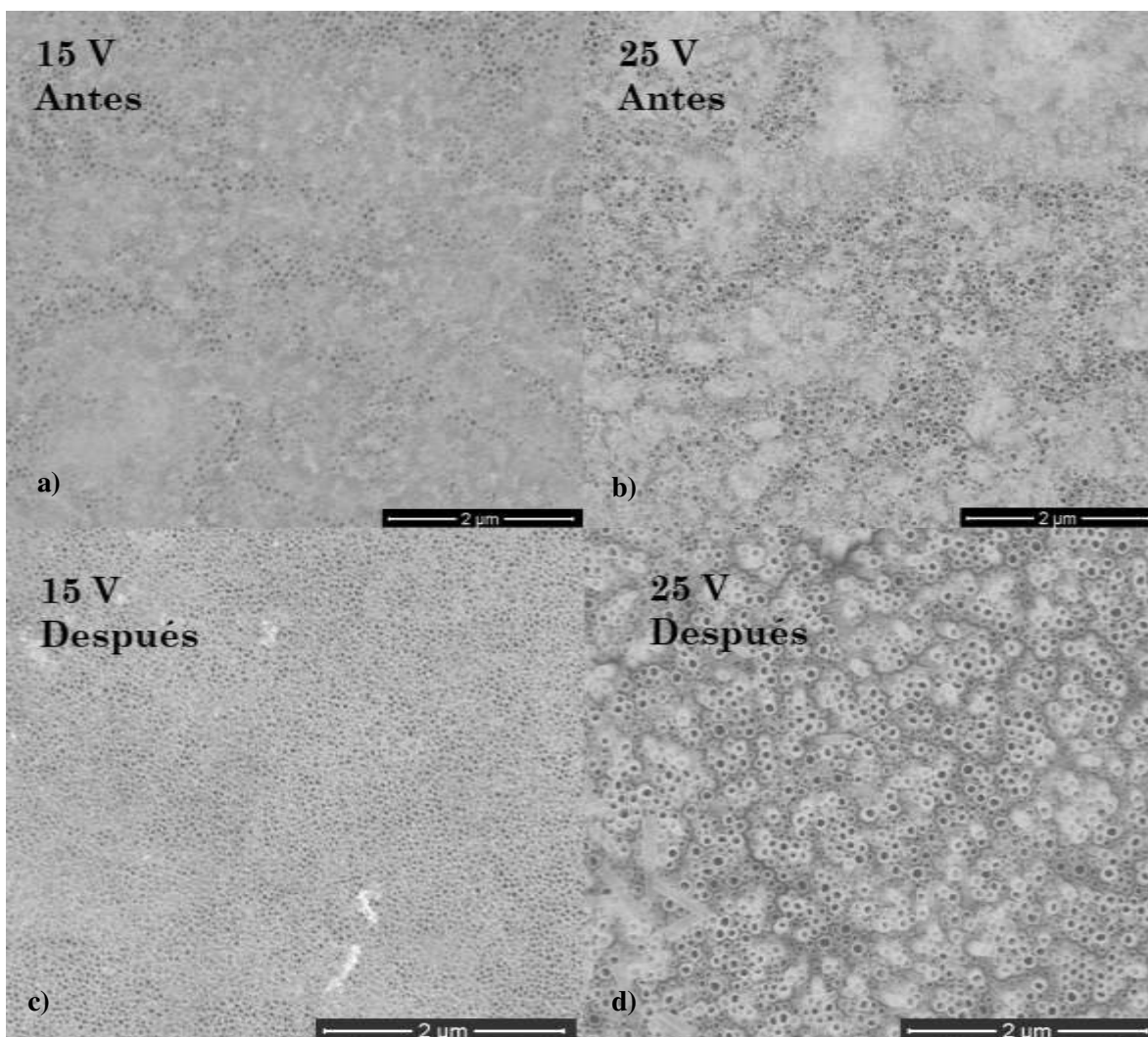
Este tipo de nanoestructuras forman una matriz porosa en la superficie del titanio lo cual es muy deseable debido a que dentro de estos poros es posible encapsular o inmovilizar distintos tipos de sustancias terapéuticas de interés tales como medicamentos, enzimas o proteínas.<sup>15,23,30</sup>

Para poder realizar esto es sumamente necesario que los poros tengan un tamaño adecuado y que estén libres de cualquier obstrucción. Sin embargo como podemos observar en las micrografías de las muestras anodizadas a distintos voltajes (figura 21 (a,b)), se puede apreciar la presencia de cúmulos o nubes de residuos de óxido después del proceso de anodizado, los cuales de acuerdo con la literatura se deben a la reacción que se lleva a cabo en la superficie de la aleación y la acción del electrolito en esta.<sup>50</sup>

Este tipo de suciedad fue tratada por distintos métodos de limpieza poniendo la muestra a sonicación rápida por tiempos cortos de entre 5s a 10s utilizando un líquido como solvente; siendo el método más efectivo la sumersión de la muestra en una mezcla de etanol-agua 50:50. En la experimentación correspondiente, al sumergir las muestras dentro del solvente del medio



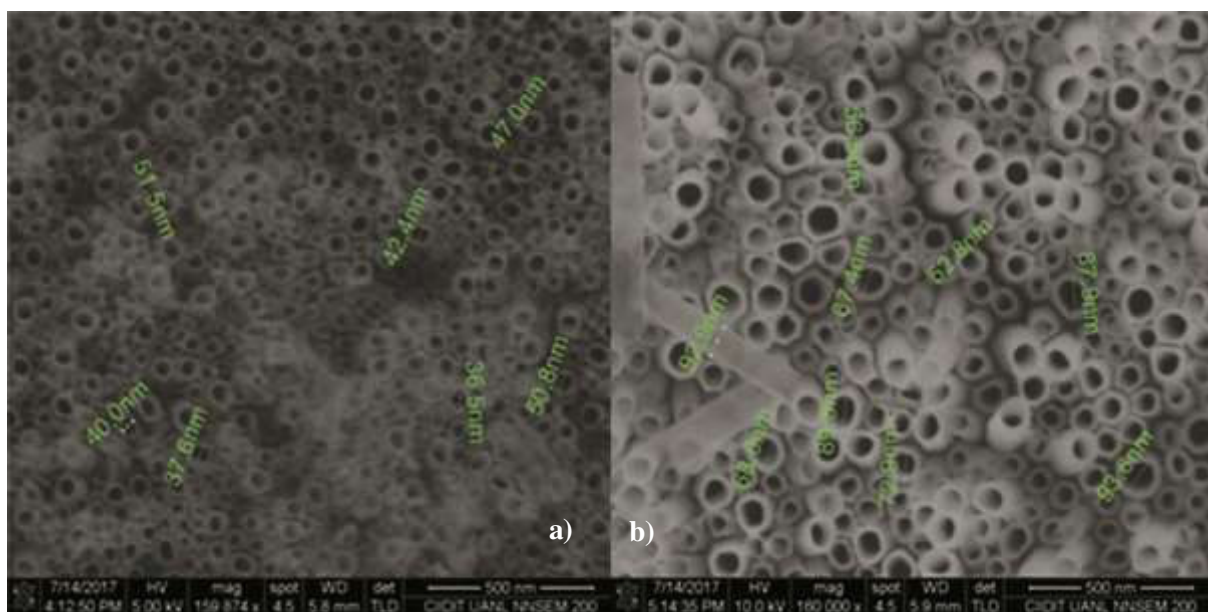
de reacción y activando la sonicación se pueden observar partículas blancas las cuales salen de la superficie anodizada.<sup>39</sup>



**Fig. 21 Muestras anodizadas a 15v y 25v antes y después de limpieza a) Muestra anodizada a 15v antes de limpieza b) Muestra anodizada a 25v antes de limpieza c) Muestra anodizada a 15v después de limpieza d) Muestra anodizada a 25v después de limpieza**

Una vez terminada la sonicación podemos observar cómo es que estas nubes o manchas de contaminación ya no aparecen en las muestras anodizadas a distintos voltajes (figura 21 (e, d)); por lo tanto podemos concluir que el método de limpieza propuesto es efectivo y nos ayuda a eliminar agentes externos o residuos que pueden alterar la correcta liberación de la enzima encapsulada. Al realizar un acercamiento a las muestras se puede observar de manera superficial la morfología de los nanotubos así mismo se pudo medir el diámetro tanto interior como exterior

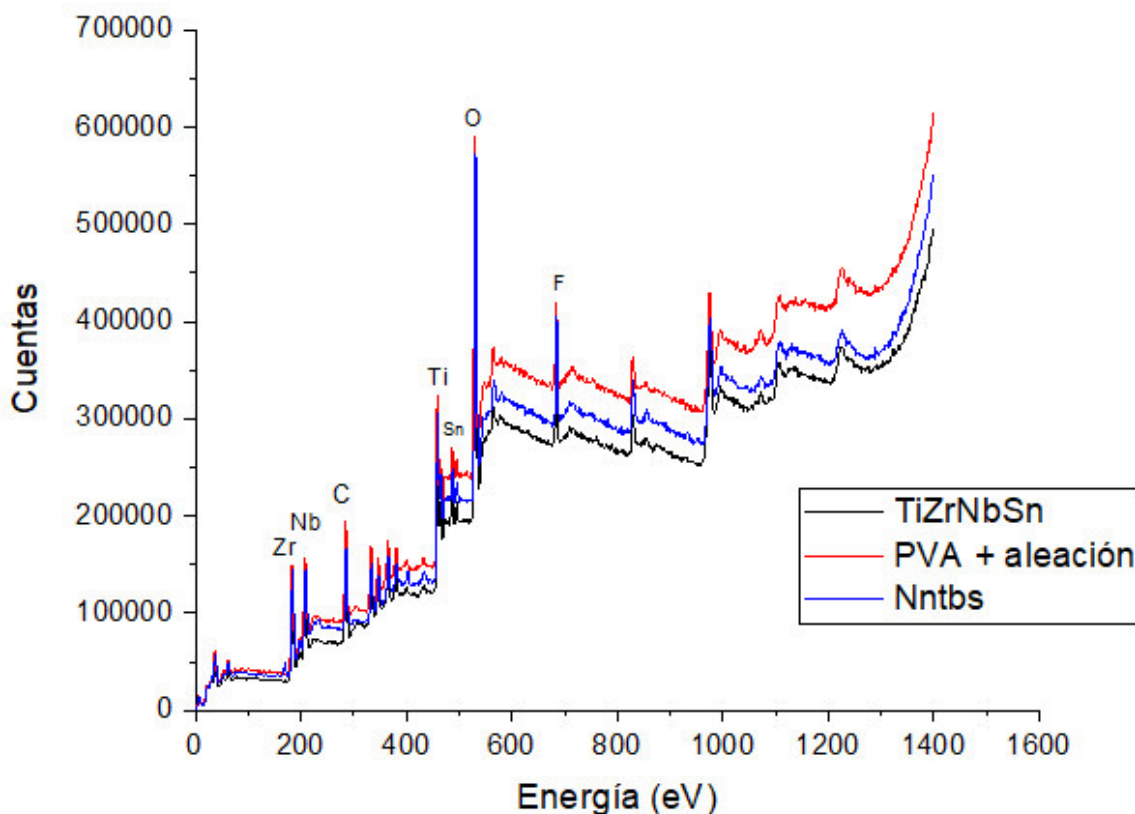
dándonos valores que oscilan entre los 50 y 95 nanómetros, esto se puede apreciar mejor en la figura 22.



**Fig. 22 Muestra anodizada a) 15v b) 25v en la cual se presentan nanotubos alineados y sus respectivas medidas**

La morfología de los nanotubos, así como los diámetros de los mismos son parte fundamental de la investigación ya que dependiendo su geometría y tamaño podremos realizar la encapsulación y liberación enzimática de una manera óptima, además de que estos funcionarán como un método para poder mantener la estructura tridimensional compleja de la enzima y de esta manera conservar su funcionalidad una vez extraída de su medio natural.

En la figura 22 podemos observar las medidas de diámetros que tienen los nanotubos sintetizados por anodizado electroquímico, como podemos observar las medidas varían entre 35 hasta 51.5 nm para los nanotubos anodizados a 15v y medidas de 68 hasta 94 nm para los nanotubos anodizados a 25 volts además se puede destacar que las estructuras observadas tienen una forma cilíndrica bien definida. De acuerdo a la literatura podemos corroborar como es que el voltaje tiene una gran influencia en el tamaño de los poros de los nanotubos y esto se puede observar de igual forma en la figura 22 (a,b) donde se observan grandes variaciones entre los nanotubos anodizados a 15 volts y 25 volts.<sup>51</sup>



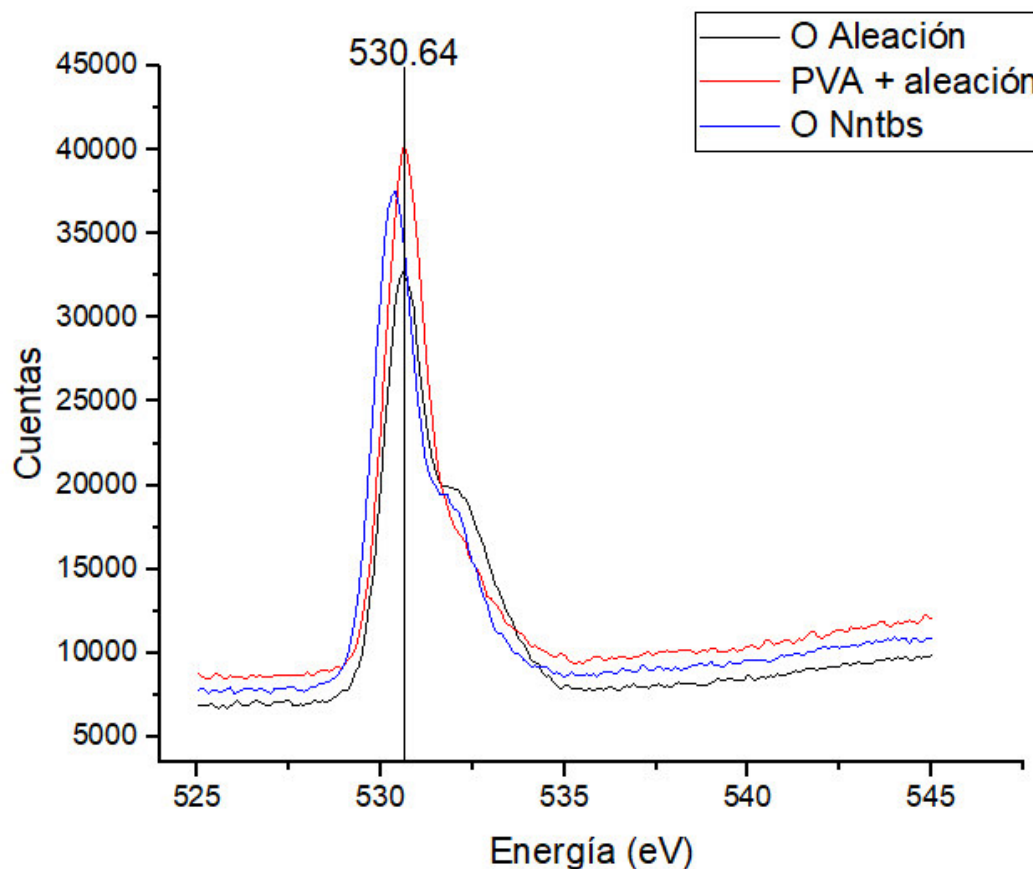
**Fig. 23** Perfil de lectura de XPS en el cual se observan los picos característicos de la aleación, los cuales fueron tomados de una muestra recién anodizada.

En la figura 23 podemos observar el análisis elemental superficial realizado a las distintas muestras por medio de la técnica de espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS por sus siglas en inglés). En el análisis de datos arrojados por esta técnica pudimos constatar los distintos elementos que componen la aleación utilizada en este trabajo de tesis. En este sentido se realizó una comparativa de la aleación sin modificar (negro), la aleación anodizada, es decir ya con nanotubos en la superficie (azul) y la aleación anodizada con nanofibras poliméricas de PVA sobre la capa de nanotubos (rojo).

Cabe mencionar que es la primera vez que se realiza un ensayo de XPS para conocer los elementos que componen esta aleación ( $\text{Ti}_{24}\text{Zr}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$ ) en particular. Como se puede observar los elementos básicos de la aleación tales como el titanio, zirconio, niobio y estaño se encuentran presentes en todas las fases de la aleación desde el momento en que esta se encuentra sin modificar hasta el momento en que es anodizada e incluso después de ser combinada con nanofibras de PVA (figura 23).

La aparición del pico del flúor se atribuye al método de anodizado ya que este utiliza iones flúor en el electrolito para poder llevar a cabo la reacción de oxidación en la superficie de la muestra.<sup>52-54</sup>

Para poder apreciar de una mejor manera las tres fases que se encuentran en la muestra se realizó un análisis elemental del pico del oxígeno por XPS y los resultados se pueden observar en la figura 24.



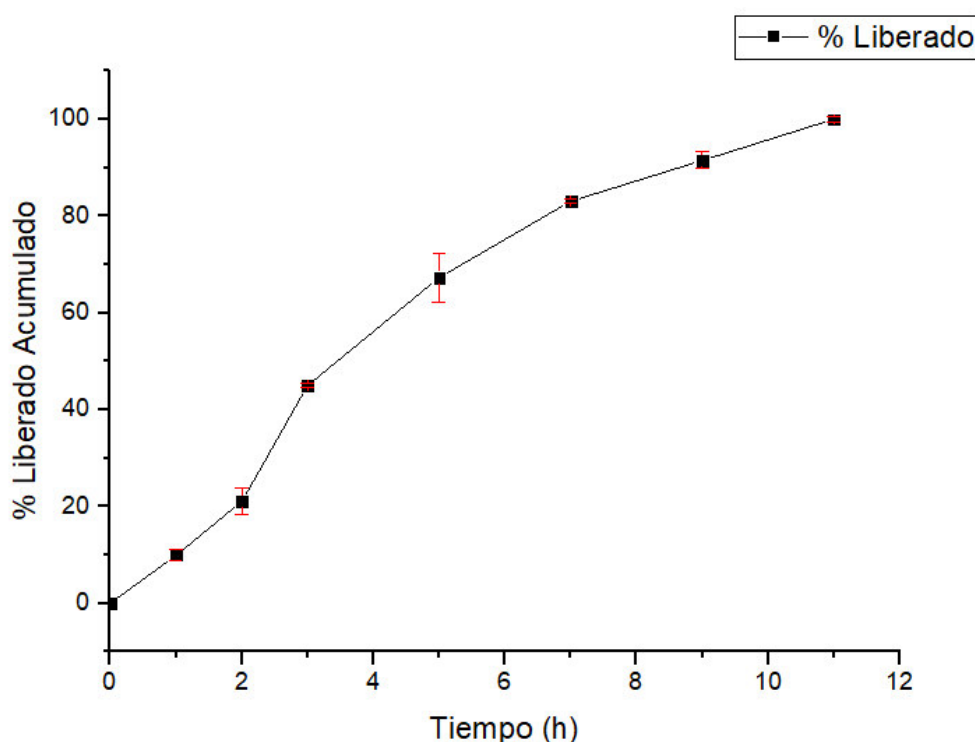
**Fig. 24 Resultados de XPS de un análisis del elemento Oxígeno en el cual se encuentran presentes: Aleación sin modificar (Negro), aleación anodizada (Azul), aleación anodizada con nanofibras en la superficie (Rojo).**

El oxígeno es esencial para comprobar los cambios por los cuales nuestra muestra se ve afectada durante los diferentes procesos de síntesis a los cuales fue sometida. El incremento de oxígeno al momento de ir anodizando se explica debido a la oxidación que recibe la parte superficial de la muestra por el método de anodizado, mientras que el aumento que recibe de oxígeno una vez que se electrohila se puede describir por la parte orgánica y la presencia de este elemento en el polímero presente en las nanofibras electrohiladas.

De acuerdo a la base de datos el oxígeno presentado en el XPS se puede asociar a un oxígeno metálico o a una posible combinación de elementos oxidados después del anodizado. (<https://srdata.nist.gov>, s.f.)

## 8.2 Liberación enzimática

Para la liberación enzimática se realizaron ensayos con la proteína de pruebas BSA ya que esta es ampliamente utilizada en distintas pruebas debido a su bajo precio así como a su alta solubilidad en solventes acuosos.<sup>55</sup>

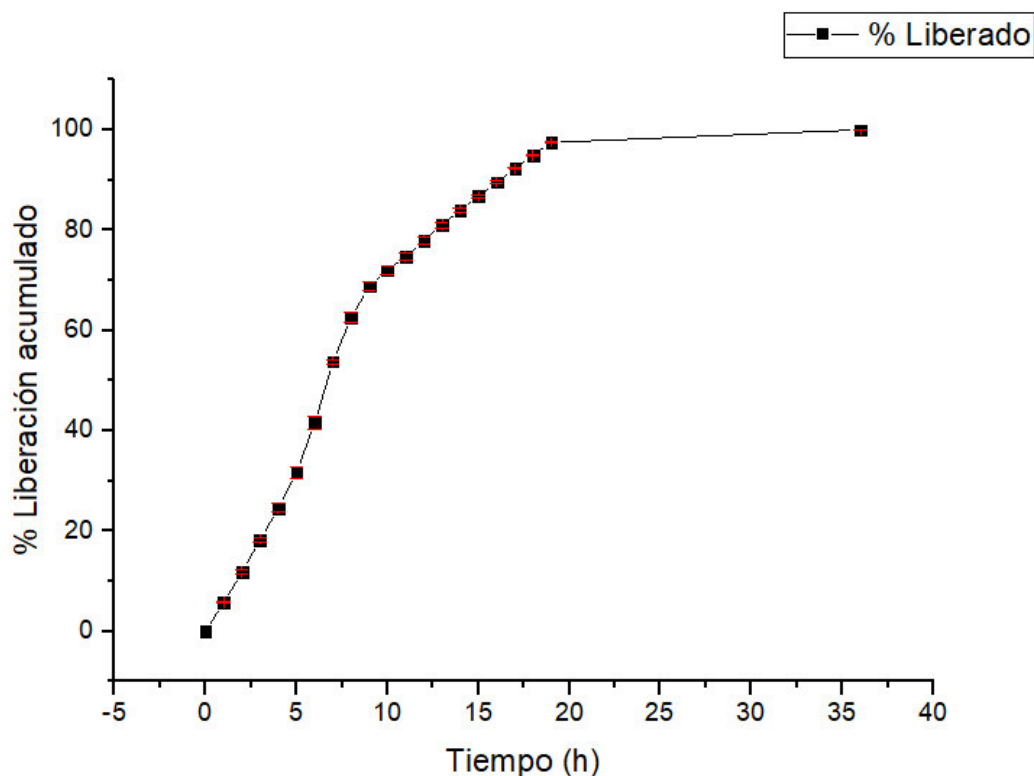


**Fig. 25 Perfil de liberación acumulada de BSA medido en porcentaje en un periodo de 12 horas**

La liberación enzimática es una prueba indispensable en los modelos de liberación ya que esta establece si nuestra plataforma de liberación es óptima y cumple con las características deseadas en un determinado contexto. Además, nos permite conocer el perfil de liberación lo cual nos da una referencia en el modelo de liberación que estamos manejando y si este cumple las características que se plantean para una posible aplicación. En la figura 25 se observa el perfil de liberación de la proteína BSA como porcentaje acumulado, se puede apreciar cómo existe una mayor liberación en los intervalos que van de 2 a 8 horas y posteriormente este tiene una

tendencia a estabilizarse. Por lo tanto, podemos asumir que la mayor parte de la carga de proteína encapsulada en los nanotubos fue liberada antes de las 8 horas y posteriormente la carga residual se liberó en el intervalo de 8 a 12 horas. Estos datos nos muestran también cómo es que la plataforma de liberación a estudiar (nanotubos de aleación de titanio) actúa como encapsulador y liberador de la proteína de prueba BSA. En este caso la muestra de BSA ha sido utilizada como proteína de pruebas en otras ocasiones en modelos de liberación con nanotubos como matriz de encapsulación y liberación dando como resultado perfiles los cuales dan a los nanotubos la posibilidad y viabilidad de ser utilizados como métodos de encapsulación y liberación de proteínas.<sup>56</sup> Se reporta que la enzima BSA ha sido utilizada como modelo estándar en la liberación de medicamentos (Sirolimus, Paclitaxel) dando un perfil de liberación similar, sin embargo un tiempo de liberación distinto, esto se puede atribuir al medio de liberación, el tamaño de los nanotubos así como una matriz de liberación de un material a base de titanio sin embargo con distinta composición de materiales.<sup>55,57</sup>

Una vez teniendo los datos de referencia de la proteína de pruebas BSA, se procedió a analizar la encapsulación y posterior liberación de la enzima bromelina en nanotubos de titanio. Sometiéndose a un procedimiento de carga enzimática en los nanotubos de aleación de titanio, de acuerdo al procedimiento descrito en la sección de metodología. Se estudió la liberación por un periodo de 40 horas en buffer (PBS pH 8) como medio de reacción dando como resultados la gráfica obtenida en la figura 26.

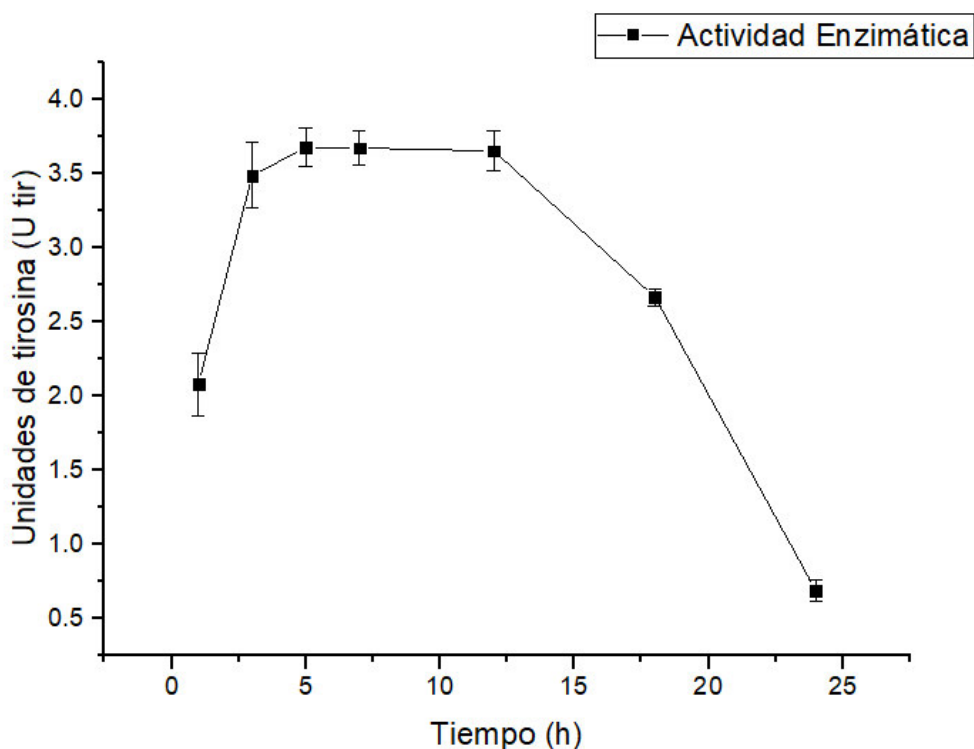


**Fig. 26 Perfil de liberación acumulado de bromelina medido en porcentaje en un periodo de 40 horas**

En la figura 26 también podemos apreciar cómo es que se lleva a cabo la liberación y dando como resultado un perfil de liberación enzimático para este sistema en particular. Este perfil hace referencia a los tiempos de liberación demostrando que el sistema tiene una liberación máxima en el intervalo que corresponde entre 5 y 10 horas, posteriormente en el intervalo de 10 a 18 horas se observa una disminución considerable en la liberación enzimática dejando así una liberación mínima o remanente en el intervalo que abarca de 19 a 40 horas.

Aunado a lo anterior podemos decir que el perfil muestra una similitud a perfiles de liberación de fármacos realizados utilizando una matriz de nanotubos de titanio para la encapsulación de la droga.<sup>58,59</sup> Además se observa que aunque el perfil es similar el perfil obtenido de bromelina presenta un tiempo de liberación muy parecido a otros estudios de liberación de fármacos sin la adición de alguna película polimérica para extender la liberación.<sup>60</sup> Tomando en cuenta lo anterior, en nuestro grupo de investigación el tiempo de liberación se plantea aumentar en un futuro mediante el uso de una membrana nanofibrosa como método de regulación de la liberación utilizando nanotubos.<sup>61</sup>

Otro dato importante en los modelos de encapsulación y liberación de enzimas es conocer la actividad enzimática de la enzima liberada. Ya que el principal objetivo de la elaboración de esta plataforma de liberación es mantener activa la enzima la mayor cantidad de tiempo posible para que esta pueda llevar a cabo las reacciones químicas pertinentes de acuerdo a su clasificación y uso una vez liberada al medio de reacción.



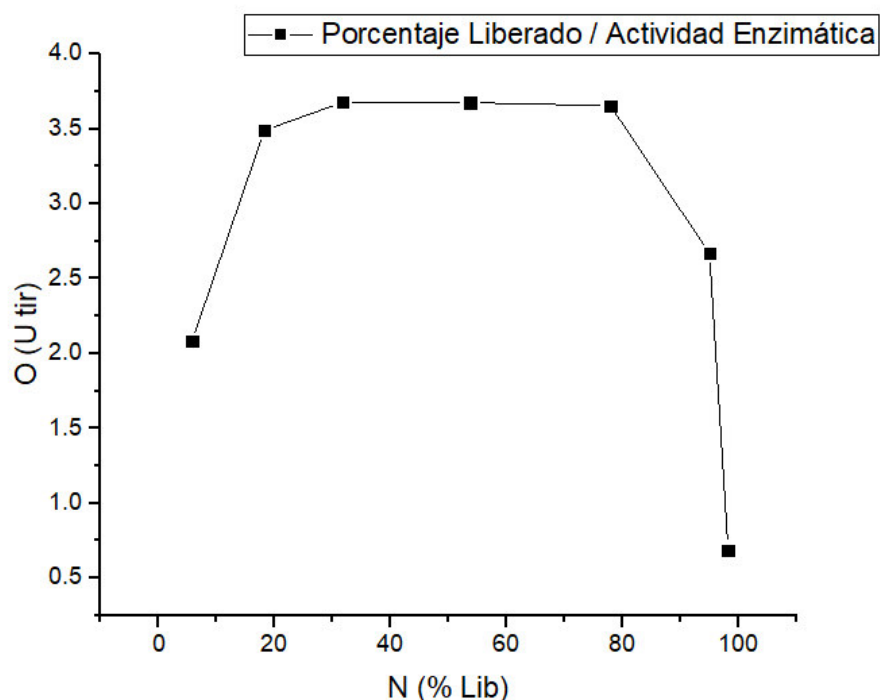
**Fig. 27 Perfil de actividad enzimática en un ensayo realizado durante 24 horas**

En la figura 27 podemos observar un perfil de actividad enzimática el cual nos da información del tiempo que la enzima bromelina liberada al medio de reacción permanece activa y cuando comienza a decrecer su actividad. Para este perfil mostrado podemos observar que la enzima se encuentra activa en la mayor parte del tiempo de duración de este ensayo. Durante el intervalo de tiempo que comprende de 5 horas a 13 horas podemos ver una estabilidad de la actividad de la bromelina por lo que se puede llegar a la conclusión que en un medio simulado de liberación, la actividad enzimática tiene un tiempo promedio de 10 horas con la actividad máxima comenzando a decrecer a partir de las 13 horas de su liberación generando una pendiente más pronunciada a partir de las 16 horas. Los datos anteriores se obtuvieron manteniendo la temperatura constante en 24 °C para evitar variaciones en la actividad esto de acuerdo a la



literatura.<sup>62</sup> Además podemos observar que los perfiles de liberación obtenidos son muy similares a otros experimentos realizados liberando distintas sustancias con aplicación terapéutica (proteína BSA, así como distintos medicamentos) usando nanotubos de titanio como medio de encapsulación.<sup>57</sup>

De acuerdo a la literatura dependiendo el buffer que se esté utilizando se ve modificada la actividad de la enzima bromelina, esto debido al cambio de pH o temperatura y la reacción buffer-enzima.<sup>48,63</sup> Además podemos ver cómo es que el decrecimiento de la actividad enzimática de la enzima liberada si bien es paulatino, se acelera rápidamente pasadas las 18 horas de su liberación dando por terminada su actividad después de la liberación a las 24 horas. Este dato es muy importante para posibles aplicaciones de la enzima como agente terapéutico ya que nos permite conocer las posibles dosis de administración de la enzima utilizando esta plataforma de liberación.



**Fig. 28 Comparativa de porcentaje de enzima liberado contra actividad enzimática**

Una vez obtenidos los datos anteriores (perfil de liberación y actividad enzimática) estos se combinaron para obtener un perfil de este método. Haciendo una comparativa entre ambos

perfiles se obtuvo la gráfica que se observa en la figura 28. En la cual podemos observar que durante la primera etapa de liberación la actividad de la enzima va aumentando hasta llegar a una actividad estable una vez alcanzada el 30% de liberación de la enzima. Esta estabilización de la actividad enzimática con respecto al porcentaje de liberación de la enzima dura hasta que se ha liberado un 80% de la enzima en el medio; es en este punto donde comienza a decrecer la actividad de manera abrupta.

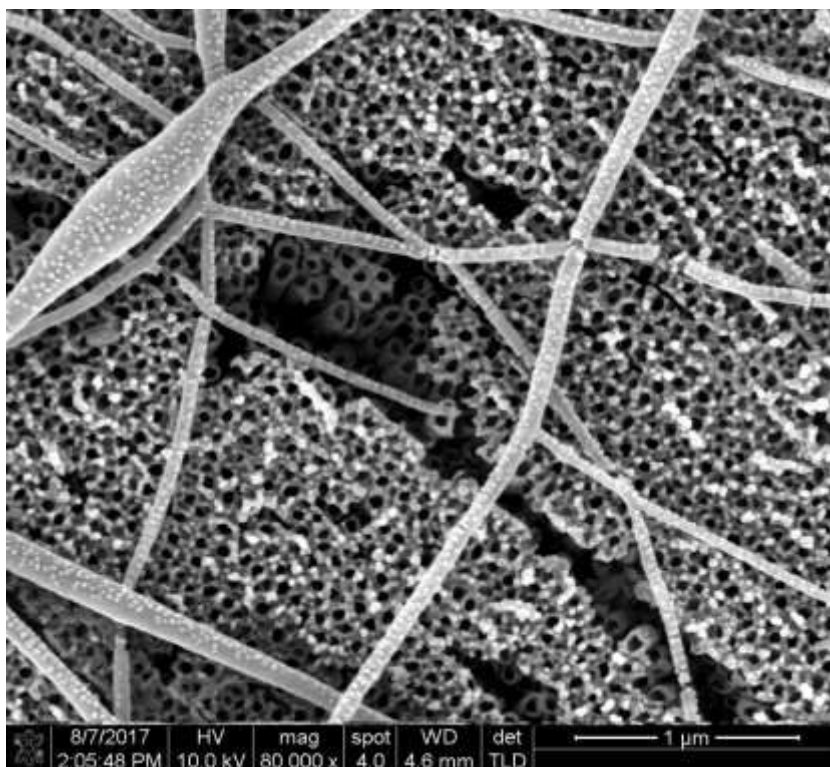
Al conocer estos datos podemos darnos una idea del funcionamiento del sistema que estamos proponiendo y podemos observar también los tiempos de duración de la actividad enzimática de la enzima liberada al medio de reacción. El máximo de actividad enzimática alcanzada a bajos niveles de liberación enzimática seguido de un período de estabilización determina que la actividad enzimática solo se incrementó mientras estuviesen disponibles moléculas de sustrato de caseína para realizar la reacción caseolítica. La cantidad de moléculas de caseína presentes en el medio de reacción solo alcanzaron a mantener la estabilidad de la enzima para un 80% de la enzima liberada, después de eso la población de moléculas de caseína en el medio de reacción fueron insuficientes para las nuevas moléculas de enzima bromelina liberadas y por lo tanto la actividad general enzimática detectada descendió de manera abrupta por encima de este porcentaje de enzima liberada. Este tipo de comportamiento es similar al reportado para otras plataformas de liberación enzimática.<sup>64</sup>

### **8.3 Electrohilado sobre nanotubos**

Los sistemas de liberación de medicamento, así como de elementos terapéuticos al cuerpo siempre han tenido ciertos problemas una vez que se requieren aplicar en prótesis, stents o al querer integrarse al cuerpo debido a que este tipo de sistemas generalmente son reconocidos por el sistema inmune como un agente externo y dañino para el cuerpo.<sup>65</sup>

Una de las grandes ventajas de los sistemas nanoestructurados es que estos por lo general pasan desapercibidos por el sistema inmune<sup>66,67</sup>, sin embargo esto no es suficiente para que puedan ser utilizados de manera correcta ya que estos presentan otro tipo de problemas como lo son la liberación descontrolada o muy rápida de la sustancia que se quiere liberar (*burst release*).<sup>21</sup> Debido a lo anterior nuestro grupo de trabajo propone como un método de control de la liberación, el uso de nanofibras poliméricas electrohiladas directamente sobre los nanotubos de

titanio anodizados. De esta manera se creará una barrera difusiva que impedirá la liberación de manera inmediata de la carga enzimática hacia el medio de reacción. Por otra parte, con la adición de las nanofibras poliméricas también se afianzará la biocompatibilidad y la bioactividad *in vivo* de estos sistemas de liberación enzimática.<sup>44</sup>

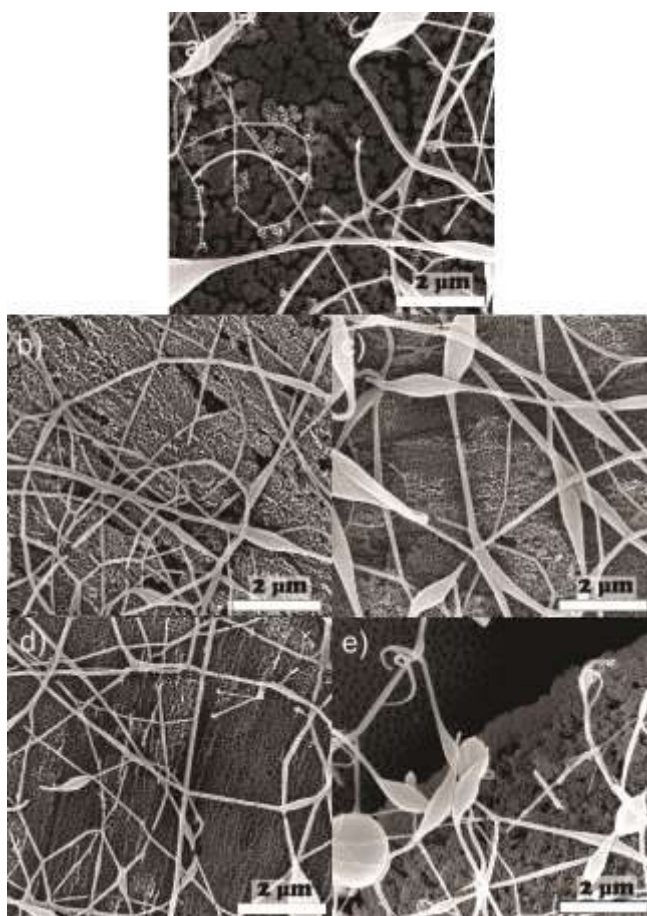


**Fig. 29 Nanofibras sobre nanotubos dos fases contiguas**

Esta parte del trabajo de investigación presentado si bien no se encuentra dentro de lo establecido en la hipótesis de esta tesis, vale la pena mencionarla ya que es parte del trabajo a futuro de esta línea de investigación y además es la primera vez que se unen estas dos nanoestructuras (nanotubos de titanio y nanofibras poliméricas) (figura 29), como potencial aplicación en la creación de un sistema de liberación. Hasta la fecha según la investigación del grupo de trabajo realizada en distintos motores de búsqueda, editoriales, paginas referentes a la ciencia, etc., no se ha encontrado un sistema de liberación que haga uso de estos dos tipos de nanoestructuras para una mejor modulación de la liberación de la carga encapsulada en los nanotubos de titanio.

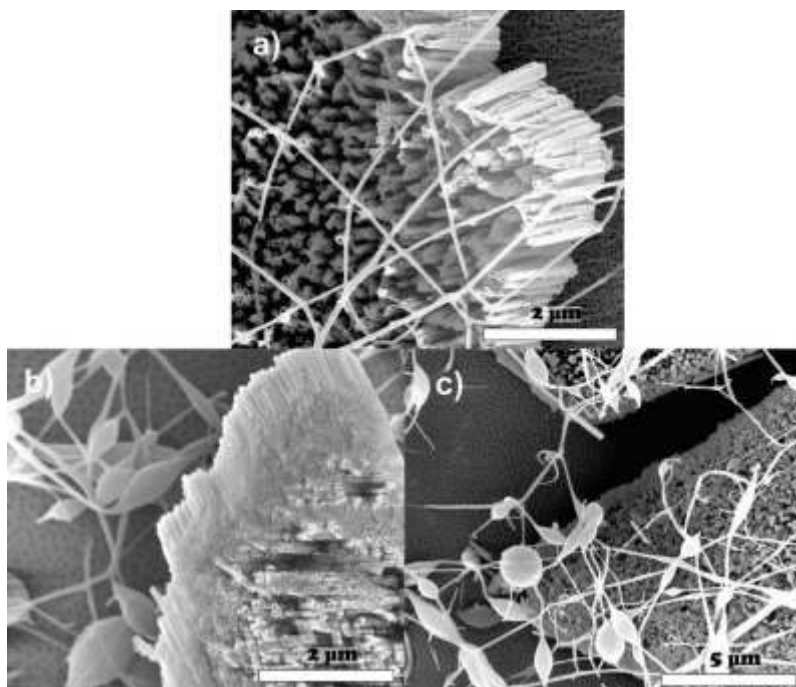
El tener dos nanoestructuras en fases contiguas conlleva una gran variedad de ventajas consigo ya que las nanofibras poliméricas son conocidas por mimetizar la matriz extracelular y esto

permite que los sistemas de nanotubos como portadores de sustancias terapéuticas puedan tener una mayor viabilidad in vivo al disminuir los riesgos que se pueden presentar al entrar en contacto con el sistema inmunológico del cuerpo. La membrana de nanofibras también funcionará como una barrera difusiva para optimizar los tiempos de liberación.



**Fig. 30** Micrografía de MEB de una muestra anodizada a 25v y electrohilada utilizando PVA a 8% como polímero a) 15s b) 30s c) 45s d) 60s e) 75s.

En la figura 30 se puede observar la morfología de la muestra correspondiente a un proceso de electrohilado a 25 V durante varios tiempos de funcionamiento del proceso de electrohilado sobre una superficie de nanotubos de aleación de titanio. En el análisis de la morfología de las dos fases que participan en este trabajo, se observó que a medida que el tiempo de electrohilado aumenta la cantidad de nanofibras depositadas lo hace proporcionalmente. Además, se puede observar que la fase de las nanofibras presentaba una morfología con defectos en forma de cuenta a tiempos más prolongados de electrohilado.



**Fig. 31** Conjunto de fases metálica/polimérica a) Conjunto de fases nanofibras/ nanotubos b) Desprendimiento de capa de nanotubos c) Red de nanofibras rodeando la capa de nanotubos

Otro efecto interesante que se presenta en este tipo de sistemas es el desprendimiento de la capa superficial de los nanotubos dando paso a que el electrohilado actúe como una red la cual cubre estas capas desprendidas como se observa en la figura 31 donde podemos ver en a) el conjunto de fases de nanofibras con los nanotubos, b) el desprendimiento de la capa superficial de los nanotubos y que las nanofibras se depositaron en la parte inferior de esta capa y c) como es que una segunda capa de nanofibras se deposita en la parte superior de la fase desprendida de nanotubos dando paso a una conformación tipo sándwich de nanotubos-nanofibras-nanotubos.

Aunque esta etapa de la investigación se encuentra en etapas preliminares, ya se presentó una comunicación al respecto y se seguirá avanzando como trabajo a futuro en esta línea de investigación.

## 9. Conclusiones

Por medio de la técnica de anodizado se pueden sintetizar nanotubos de aleación de titanio con una morfología bien definida y de una manera simple.

Es posible utilizar nanotubos de titanio como un sistema encapsulador y liberador enzimático gracias a sus propiedades de biocompatibilidad y tipo de nanoestructura porosa 1D.

Es posible sintetizar nanotubos de óxido de la aleación  $\text{Ti}_{24}\text{Zn}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$  por medio de la técnica anodizado electroquímico.

Es posible utilizar nanotubos de titanio como sistema de encapsulación proteínica, es decir cargar los nanotubos de titanio con proteínas (BSA) para posteriormente ser liberadas como sistema preliminar en el estudio de liberación enzimática de bromelina.

Es posible utilizar nanotubos de titanio como sistema de encapsulación enzimática, es decir cargar los nanotubos con una enzima de interés (bromelina) para posteriormente ser liberada.

Los nanotubos pueden ser utilizados para la liberación enzimática lo cual les abre panorama para posibles aplicaciones de dosificación local enzimática.

La encapsulación enzimática en nanotubos logra conservar la estructura compleja de las enzimas para su posterior liberación en forma de una enzima activa, lo cual se traduce en los análisis de actividad enzimática.

Como un punto importante planteado en los objetivos de este trabajo de tesis, la actividad enzimática de la enzima bromelina liberada sigue presente durante las primeras 24 horas a partir de su liberación.

Es posible el electrohilar nanofibras poliméricas utilizando una matriz de nanotubos de titanio como colector para poder tener una plataforma de liberación compleja el cual abarca el uso de dos nanoestructuras para poder modular la liberación de la enzima hacia el medio de reacción.

Otra importante aportación de las nanofibras poliméricas las cuales además de controlar la liberación pueden potencialmente aportar propiedades que mejoren la biocompatibilidad del sistema.

## 10. Referencias

1. Gultepe E, Nagesha D, Sridhar S, Amiji M. Nanoporous inorganic membranes or coatings for sustained drug delivery in implantable devices ☆. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(3):305-315. doi:10.1016/j.addr.2009.11.003.
2. Minagar S, Berndt CC, Wang J, Ivanova E, Wen C. A review of the application of

- anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. *Acta Biomater.* 2012;8(8):2875-2888. doi:10.1016/j.actbio.2012.04.005.
3. Vasilev K, Poh Z, Kant K, Chan J, Micheltmore A, Losic D. Tailoring the surface functionalities of titania nanotube arrays. *Biomaterials.* 2010;31(3):532-540. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.074.
  4. Magnani M. Drug delivery and targeting system. *Emerg Ther Targets.* 1998;2(1):145-146. doi:10.1517/14728222.2.1.145.
  5. Hoffman AS. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. *J Control Release.* 2008;132(3):153-163. doi:10.1016/j.jconrel.2008.08.012.
  6. Vallet-Regí M, Balas F, Arcos D. Mesoporous materials for drug delivery. *Angew Chemie - Int Ed.* 2007;46(40):7548-7558. doi:10.1002/anie.200604488.
  7. Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials.* 2008;29(13):1989-2006. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.
  8. Song Y-Y, Schmidt-Stein F, Bauer S, Schmuki P. Amphiphilic TiO<sub>2</sub> Nanotube Arrays: An Actively Controllable Drug Delivery System. *J Am Chem Soc.* 2009;131(12):4230-4232. doi:10.1021/ja810130h.
  9. Bianco A, Kostarelos K, Prato M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr Opin Chem Biol.* 2005;9(6):674-679. doi:10.1016/j.cbpa.2005.10.005.
  10. Valiev RZ, Semenova IP, Latysh V V., et al. Nanostructured titanium for biomedical applications. *Adv Eng Mater.* 2008;10(8):15-17. doi:10.1002/adem.200800026.
  11. Bedi RS, Beving DE, Zanello LP, Yan Y. Biocompatibility of corrosion-resistant zeolite coatings for titanium alloy biomedical implants. *Acta Biomater.* 2009;5(8):3265-3271. doi:10.1016/j.actbio.2009.04.019.
  12. Niinomi M. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2008;1(1):30-42. doi:10.1016/j.jmbbm.2007.07.001.

13. Ekambaram S, Rachita L, Kiran MS, Korrapati PS. Fabrication of core – shell nano fibers for controlled delivery of bromelain and salvianolic acid B for skin regeneration in wound therapeutics. *Biomed Mater.* 2017;12.
14. Chobotova K, Vernallis AB, Majid FAA. Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. *Cancer Lett.* 2010;290(2):148-156. doi:10.1016/j.canlet.2009.08.001.
15. Macák JM, Tsuchiya H, Schmuki P. High-aspect-ratio TiO<sub>2</sub> nanotubes by anodization of titanium. *Angew Chemie - Int Ed.* 2005;44(14):2100-2102. doi:10.1002/anie.200462459.
16. Gulati K, Kant K, Findlay D, Losic D. Periodically tailored titania nanotubes for enhanced drug loading and releasing performances. *J Mater Chem B.* 2015;3(12):2553-2559. doi:10.1039/C4TB01882F.
17. Aw MS, Gulati K, Losic D. Controlling Drug Release from Titania Nanotube Arrays Using Polymer Nanocarriers and Biopolymer Coating. *J Biomater Nanobiotechnol.* 2011;02(05):477-484. doi:10.4236/jbmb.2011.225058.
18. Mor GK, Varghese OK, Paulose M, Grimes CA. Transparent highly ordered TiO<sub>2</sub> nanotube arrays via anodization of titanium thin films. *Adv Funct Mater.* 2005;15(8):1291-1296. doi:10.1002/adfm.200500096.
19. Moiola EK, Clark PA, Xin X, Lal S, Mao JJ. Matrices and scaffolds for drug delivery in dental, oral and craniofacial tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(4-5):308-324. doi:10.1016/j.addr.2007.03.019.
20. Eskandarloo H, Hashempour M, Vincenzo A, et al. High-temperature stable anatase-type TiO<sub>2</sub> nanotube arrays: A study of the structure-activity relationship. *Appl Catal B Environ.* 2016;185:119-132. doi:10.1016/j.apcatb.2015.11.048.
21. Ma M, Kazemzadeh-Narbat M, Hui Y, et al. Local delivery of antimicrobial peptides using self-organized TiO<sub>2</sub> nanotube arrays for peri-implant infections. *J Biomed Mater Res Part A.* 2012;100A(2):278-285. doi:10.1002/jbm.a.33251.
22. Crawford GA, Chawla N, Das K, Bose S, Bandyopadhyay A. Microstructure and



- deformation behavior of biocompatible TiO<sub>2</sub>nanotubes on titanium substrate. *Acta Biomater.* 2007;3(3 SPEC. ISS.):359-367. doi:10.1016/j.actbio.2006.08.004.
23. López Pavón L, Dagnino-Acosta D, Moreno-Cortez IE, et al. A novel method for fabrication of Ti<sub>24</sub>Zr<sub>10</sub>Nb<sub>2</sub>Sn alloy oxide nanotubes-chitosan nanocomposite films. *Mater Lett.* 2017;205:134-137. doi:10.1016/j.matlet.2017.06.078.
  24. Wang J, Lin Z. Anodic Formation of Ordered TiO Nanotube Arrays : Effects of Electrolyte Temperature and Anodization Potential Anodic Formation of Ordered TiO<sub>2</sub> Nanotube Arrays : Effects of Electrolyte Temperature and Anodization Potential. 2009;4026-4030. doi:10.1021/jp811201x.
  25. Pavón LL, Kim HY, Hosoda H, Miyazaki S. Effect of Nb content and heat treatment temperature on superelastic properties of Ti-24Zr-(8-12)Nb-2Sn alloys. *Scr Mater.* 2015;95(1):46-49. doi:10.1016/j.scriptamat.2014.09.029.
  26. Hasan Khan R, Rasheedi S, Haq SK. Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. *J Biosci.* 2003;28(6):709-714. doi:10.1007/BF02708431.
  27. Wu L, Wu S, Xu Z, Qiu Y, Li S, Xu H. Biosensors and Bioelectronics Modified nanoporous titanium dioxide as a novel carrier for enzyme immobilization. *Biosens Bioelectron.* 2016;80:59-66. doi:10.1016/j.bios.2016.01.045.
  28. Deva Kumar ET, Ganesh V. Immobilization of Horseradish Peroxidase Enzyme on Nanoporous Titanium Dioxide Electrodes and Its Structural and Electrochemical Characterizations. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014;174(3):1043-1058. doi:10.1007/s12010-014-0999-7.
  29. Yang Z, Xu Y, Li J, et al. An enzymatic glucose biosensor based on a glassy carbon electrode modified with cylinder-shaped titanium dioxide nanorods. *Microchim Acta.* 2015;182(9-10):1841-1848. doi:10.1007/s00604-015-1519-3.
  30. Rowan AD. Stem Bromelain. *Handb Proteolytic Enzym.* 2013;2:1871-1873. doi:10.1016/B978-0-12-382219-2.00423-3.
  31. Ota S, Fu T-H, Hirohata R. Studies on Bromelain. *J Biochem.* 1961;49(6):532-537.

32. Brien S, Lewith G, Walker A, Hicks SM, Middleton D. Bromelain as a Treatment for Osteoarthritis: a Review of Clinical Studies. *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2004;1(3):251-257. doi:10.1093/ecam/neh035.
33. Baker PJ, Patwardhan S V., Numata K. Synthesis of homopolypeptides by aminolysis mediated by proteases encapsulated in silica nanospheres. *Macromol Biosci*. 2014;14(11):1619-1626. doi:10.1002/mabi.201400295.
34. Bernela M, Ahuja M, Thakur R. Enhancement of anti-inflammatory activity of bromelain by its encapsulation in katira gum nanoparticles. *Carbohydr Polym*. 2016;143:18-24. doi:10.1016/j.carbpol.2016.01.055.
35. Sang H, Gyoung T, Gwan T. Surface-functionalized electrospun nano fi bers for tissue engineering and drug delivery ☆. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(12):1033-1042. doi:10.1016/j.addr.2009.07.007.
36. Li BD, Xia Y. Electrospinning of Nanofibers : Reinventing the Wheel ?\*\*. 2004;(14):1151-1170. doi:10.1002/adma.200400719.
37. Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, Bowlin GL. Nanofiber technology : Designing the next generation of tissue engineering scaffolds ☆. 2007;59:1413-1433. doi:10.1016/j.addr.2007.04.022.
38. Uzun SD, Kayaci F, Uyar T, Timur S, Toppare L. Bioactive Surface Design Based on Functional Composite Electrospun Nano fi bers for Biomolecule Immobilization and Biosensor Applications. 2014. doi:10.1021/am5005927.
39. Feng XJ, Macak JM, Albu SP, Schmuki P. Electrochemical formation of self-organized anodic nanotube coating on Ti-28Zr-8Nb biomedical alloy surface. *Acta Biomater*. 2008;4(2):318-323. doi:10.1016/j.actbio.2007.08.005.
40. Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning : A fascinating fi ber fabrication technique. 2010;28:325-347. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
41. Deitzel J., Kleinmeyer J, Harris D, Beck Tan N. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer (Guildf)*. 2001;42(1):261-272. doi:10.1016/S0032-3861(00)00250-0.

42. Prakasam HE, Shankar K, Paulose M, Varghese OK, Grimes CA. A new benchmark for TiO<sub>2</sub> nanotube array growth by anodization. *J Phys Chem C*. 2007;111(20):7235-7241. doi:10.1021/jp070273h.
43. Hern JM. Juan Manuel Hernández López. 2015.
44. Ketnawa S, Chaiwut P, Rawdkuen S. Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food Bioprod Process*. 2012;90(3):385-391. doi:10.1016/j.fbp.2011.12.006.
45. Benucci I, Liburdi K, Garzillo AMV, Esti M. Bromelain from pineapple stem in alcoholic-acidic buffers for wine application. *Food Chem*. 2011;124(4):1349-1353. doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.087.
46. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
47. Caffini NO, Natalucci CL, Priolo NS, Buttazzoni MS. Proteasas de Bromeliaceae. IV. Aislamiento de una Fitoproteasa Sulfhidrílica presente en Frutos de Bromelia serra Griseb. *Acta Farm Bonaer*. 1988;7(1):9-14.
48. Corzo CA, Waliszewski KN, Welte-Chanes J. Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates. *Food Chem*. 2012;133(3):631-635. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.119.
49. Ayob SNSA, Hashim U. Titanium dioxide nanowires-based interdigitated electrodes for biomedical application. *2012 IEEE-EMBS Conf Biomed Eng Sci IECBES 2012*. 2012;(December):126-128. doi:10.1109/IECBES.2012.6498059.
50. Roy P, Berger S, Schmuki P. TiO<sub>2</sub> nanotubes: Synthesis and applications. *Angew Chemie - Int Ed*. 2011;50(13):2904-2939. doi:10.1002/anie.201001374.
51. Bauer S, Kleber S, Schmuki P. TiO<sub>2</sub> nanotubes: Tailoring the geometry in H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/HF electrolytes. *Electrochem commun*. 2006;8(8):1321-1325. doi:10.1016/j.elecom.2006.05.030.

52. Munirathinam B, Neelakantan L. Titania nanotubes from weak organic acid electrolyte: Fabrication, characterization and oxide film properties. *Mater Sci Eng C*. 2015;49:567-578. doi:10.1016/j.msec.2015.01.045.
53. Morra S, Valetti F, Sarasso V, Castrignanò S, Sadeghi SJ, Gilardi G. Hydrogen production at high Faradaic efficiency by a bio-electrode based on TiO<sub>2</sub> adsorption of a new [FeFe]-hydrogenase from *Clostridium perfringens*. *Bioelectrochemistry*. 2015;106:258-262. doi:10.1016/j.bioelechem.2015.08.001.
54. Yasuda K, Schmuki P. Control of morphology and composition of self-organized zirconium titanate nanotubes formed in (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/NH<sub>4</sub>F electrolytes. *Electrochim Acta*. 2007;52(12):4053-4061. doi:10.1016/j.electacta.2006.11.023.
55. Peng L, Mendelsohn AD, LaTempa TJ, Yoriya S, Grimes CA, Desai TA. Long-Term small molecule and protein elution from tio 2 nanotubes. *Nano Lett*. 2009;9(5):1932-1936. doi:10.1021/nl9001052.
56. Popat KC, Eltgroth M, Desai TA. Drug-delivery systems. 2007;16802:1878-1881. doi:10.1002/sml.200700412.
57. Losic D, Simovic S. Self-ordered nanopore and nanotube platforms for drug delivery applications. *Expert Opin Drug Deliv*. 2009;6(12):1363-1381. doi:10.1517/17425240903300857.
58. Gulati K, Ramakrishnan S, Sinn M, Atkins GJ, Findlay DM, Losic D. Acta Biomaterialia Biocompatible polymer coating of titania nanotube arrays for improved drug elution and osteoblast adhesion. *Acta Biomater*. 2012;8(1):449-456. doi:10.1016/j.actbio.2011.09.004.
59. Wang T, Weng Z, Liu X, Yeung KWK, Pan H, Wu S. Controlled release and biocompatibility of polymer/titania nanotube array system on titanium implants. *Bioact Mater*. 2017;2(1):44-50. doi:10.1016/j.bioactmat.2017.02.001.
60. Popat KC, Eltgroth M, LaTempa TJ, Grimes CA, Desai TA. Decreased Staphylococcus epidermis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes. *Biomaterials*. 2007;28(32):4880-4888.

doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.037.

61. Feng W, Geng Z, Li Z, et al. Controlled release behaviour and antibacterial effects of antibiotic-loaded titania nanotubes. *Mater Sci Eng C*. 2016;62:105-112.  
doi:10.1016/j.msec.2016.01.046.
62. MURACHI T, NEURATH H. Fractionation and specificity studies on stem bromelain. *J Biol Chem*. 1960;235(1):99-107.
63. Itoyama K, Tanibe H, Hayashi T, Ikada Y. Spacer effects on enzymatic activity of papain immobilized onto porous chitosan beads. *Biomaterials*. 1994;15(2):107-112.  
doi:10.1016/0142-9612(94)90258-5.
64. Rojas-mercado AS, Moreno-cortez IE, Lucio- R, Pavón LL. Encapsulation and immobilization of ficin extract in electrospun. *Int J Biol Macromol*. 2018:#pagerange#. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.07.113.
65. Shokuhfar T, Sinha-Ray S, Sukotjo C, Yarin AL. Intercalation of anti-inflammatory drug molecules within TiO<sub>2</sub> nanotubes. *RSC Adv*. 2013;3(38):17380.  
doi:10.1039/c3ra42173b.
66. Dobrovolskaia M a, Aggarwal P, Hall JB, Mcneil SE. Preclinical studies to understand NP interaction with the immune system and its potential effects on NP biodistribution. *Mol Pharm*. 2009;5(4):487-495. doi:10.1021/mp800032f.Preclinical.
67. Zolnik BS, González-Fernández Á, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. Minireview: Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology*. 2010;151(2):458-465.  
doi:10.1210/en.2009-1082.

## 11. Referencias de imágenes

Cipriano, A. F. (2014). *Researchgate*. Retrieved from [www.researchgate.net/figure/Scheme-of-titania-nanotube-TNT-Ti-implants-modified-with-polymer-film-a-Bare-TNT\\_fig6\\_267451183](http://www.researchgate.net/figure/Scheme-of-titania-nanotube-TNT-Ti-implants-modified-with-polymer-film-a-Bare-TNT_fig6_267451183)

*depositphotos*. (n.d.). Retrieved from <https://mx.depositphotos.com/7245385/stock-photo-knee-and-titanium-hinge-joint.html>

*Drugbank*. (n.d.). Retrieved from [www.drugbank.ca/drugs/DB12249](http://www.drugbank.ca/drugs/DB12249)

<https://srdata.nist.gov>. (n.d.). *XPS Data Base*. Retrieved from <https://srdata.nist.gov>:  
<https://srdata.nist.gov>

Khalid, N. (2016). *Researchgate.ne*. Retrieved from [www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-bromelain-found-in-pineapple-juice\\_fig1\\_298815490](http://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-bromelain-found-in-pineapple-juice_fig1_298815490)

Lafayette W, D. J. (n.d.). *Bioquímica ilustrada*.

López Pavón L, D.-A. D.-C. (n.d.). A novel method for fabrication of Ti24Zr10Nb2Sn alloy oxide nanotubes-chitosan nanocomposite films.

LÓPEZ, J. M. (2015). Funcionalización superficial de aleaciones de titanio mediante anodizado para aplicaciones biomédicas .

*Posgradoeinvestigacion UADEC*. (n.d.). Retrieved from  
<http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%2012/3.html>

Sánchez, L. M. (2013). ELECTROSPINNING: LA ERA DE LAS NANOFIBRAS. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 18.

Tian, W. W. (2014). *Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized on unhybridized titanium dioxide nanotube arrays*. Springer.

*www.hindawi.com*. (n.d.). Retrieved from [www.hindawi.com/journals/jnm/2012/393042/fig2/](http://www.hindawi.com/journals/jnm/2012/393042/fig2/).